

NGHIÊN CỨU TÁCH CHIẾT FLAVONOID TỪ CÂY CÚC TÀN (*Pluchea indica* (L.) LESS) VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHÚNG

NGUYỄN THỊ TRANG ⁽¹⁾, LƯU ANH VĂN ⁽²⁾, NGUYỄN ĐỨC TRUNG ⁽¹⁾, ĐẶNG MINH HIẾU ⁽³⁾,
ĐÀM THÚY HẰNG ⁽¹⁾, LÊ TUẤN ⁽¹⁾, NGUYỄN TRƯỜNG GIANG ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cúc tần có tên khoa học là *Pluchea indica* (L.) Less, là một cây thuốc nam thuộc họ Cúc. Cúc tần chứa nhiều hợp chất thứ cấp có lợi cho sức khỏe con người nên được ứng dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian, trong đông y và trong cả y học hiện đại. Ở Việt Nam trong y học cổ truyền lá, cành, rễ cúc tần được dùng để chữa cảm, sốt, bệnh đường tiêu hóa, ly, đau nhức xương khớp, chấn thương [1]. Trong khi đó, ở Trung Quốc nó được dùng để chữa viêm hạch bạch huyết, ở Thái Lan nó được dùng chữa bệnh trĩ, đau thắt lưng và viêm [2,5]. Ở Ấn Độ nó được sử dụng để chữa một số bệnh như đau thắt lưng, sỏi thận, đi ngoài ra máu, viêm, loét hoại tử và teo cơ, trĩ, kiết lỵ, bệnh về mắt, ngứa da, axit dạ dày, khó tiểu, đau bụng, ghê, sốt, đau cơ, kiết lỵ, bệnh tiểu đường, thấp khớp. Cây hoặc lá của nó được sử dụng phổ biến dưới dạng trà để điều trị bệnh tiểu đường và thấp khớp [3]. Jonathan và cộng sự đã báo cáo về khả năng ức chế tăng sinh và di chuyển của tế bào ung thư u thần kinh đệm GBM8401 và tế bào ung thư cổ tử cung HeLa của dịch chiết thô lá và rễ cây cúc tần. Sau 48 giờ khả năng ức chế tăng sinh và sống sót với hai loại tế bào đó lần lượt là 75% và 70% [4]. Buapool và cộng sự đã chứng minh được khả năng chống viêm trong phù tai, phù chân ở chuột của dịch chiết ethanol từ lá cúc tần [2], các hoạt tính kháng amip, chống oxy hóa, ức chế acetylcholinesterase cũng đã được chứng minh [5, 6, 7]. Một nghiên cứu khác cho thấy cây cúc tần có chứa sesquiterpenoid, flavonoid, các nhóm chất thơm...[8]. Phan Minh Giang và cộng sự đã phân lập được một số terpenoid, phytosterol từ lá cây cúc tần [9]; sterol, glycerol ester và thiophen từ cành cây cúc tần [10] trong khi đó Jonathan khẳng định được sự có mặt của flavonoid, tannin, saponin, proanthocyanidin trong dịch chiết từ rễ cây cúc tần [4].

Trên thế giới, flavonoid từ cúc tần là nhóm chất cũng đã được quan tâm nghiên cứu [11, 12], chúng có nhiều hoạt tính sinh học ưu việt, trong đó quan trọng nhất là hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm [13, 14]. Mục tiêu nghiên cứu này nhằm chiết xuất flavonoid tổng số có trong cúc tần Việt Nam cũng như đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu cao chiết tổng số và mẫu cao chiết flavonoid sau tinh sạch.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá và cành non cúc tần được thu hái tại xã Bắc Hồng, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội (tọa độ 21.170954, 105.807875). Nguyên liệu được rửa sạch để ráo nước sau đó sấy khô ở nhiệt độ 60±2 °C cho đến độ ẩm 15±0,5 %, xay nhỏ (đến kích

thước 1-5 mm), bảo quản mẫu ở nhiệt độ thường. Loại bỏ tinh dầu trong nguyên liệu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước (chưng cất trong 4 giờ). Bã thu được sấy khô ở 85°C đến độ ẩm xấp xỉ 10%, sau đó được dùng làm nguyên liệu trích ly flavonoid. Nguyên liệu được xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi, nhiệt độ sấy 105±0,5 °C.



Hình 1. Nguyên liệu Cúc tần tươi và khô sau khi xay nhỏ

2.2. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn kiểm định: *Bacillus cereus* ATCC 13061, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 49132, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 được lấy từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội.

Các môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi sinh vật: Môi trường hoạt hóa - môi trường LB (Cao nấm men 5 g/L; pepton 10 g/L; NaCl 10 g/L). Môi trường giữ giống trong ống thạch nghiêng - môi trường LA (Cao nấm men 5 g/L; pepton 10 g/L; NaCl 10 g/L; 2% agar).

2.3. Hóa chất

Các dung môi: methanol (99,8%), ethylacetat (99,8%), n-butanol (99,4%), acid formic (95%) là hóa chất tinh khiết cho phân tích được cung cấp từ hãng Sigma-Aldrich; các dung môi axeton, axit acetic, axit clohydric, toluen, ethanol (99,7%) là các hóa chất tinh khiết được cung cấp bởi công ty hóa chất Đức Giang, Việt Nam.

Một số hóa chất thông dụng khác: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich); DMSO (dimethyl sulfoxid 99,9%, Trung Quốc); tween 80 (Sigma-Aldrich); nhựa XAD-2 (Sigma-Aldrich); sắt III clorua (Sigma-Aldrich); natri hydroxit, natri nitrit, natri clorua, natri cacbonat là các hóa chất tinh khiết cho phân tích được cung cấp bởi công ty Đức Giang, Việt Nam.

Các chất chuẩn và kháng sinh: Vitamin C (L-ascorbic acid 99,9%, Sigma-Aldrich); quercetin (≥95%, Sigma-Aldrich); gentamicin (80mg/2ml, HDpharma, Việt Nam); penicillin (G 1 000 000 IU, Mekophar, Việt Nam).

2.4. Khảo sát điều kiện trích ly flavonoid

Tiến hành trích ly 15 g nguyên liệu ở những điều kiện khác nhau, chlorophyll trong dịch sau trích ly được loại bỏ bằng n-butanol. Cô đặc thu được cao tổng bằng máy cô quay chân không Buchi Rotavapor R-300 dưới áp suất 650 mmHg ở 50°C.

2.4.1. Khảo sát phương pháp và loại dung môi trích ly

Sử dụng phương pháp ngâm chiết và chiết Soxhlet, dung môi methanol tuyệt đối và ethanol tuyệt đối. Tỷ lệ dung môi trích ly là 1:20 (w:v). Phương pháp ngâm chiết: ngâm trong bình tam giác, nhiệt độ phòng, trong 48 giờ. Phương pháp chiết soxhlet: chiết trong 4 giờ, duy trì nhiệt độ sôi của dung môi.

2.4.2. Khảo sát phương pháp và thời gian trích ly

Phương pháp ngâm chiết: khảo sát ở thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Phương pháp chiết soxhlet: khảo sát ở thời gian 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ.

2.4.3. Khảo sát tỷ lệ dung môi trích ly

Khảo sát các tỷ lệ nguyên liệu : dung môi 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 (w:v)

2.5. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng flavonoid tổng số (TFC) theo phương pháp của Marinova [15]. Theo đó, xác định TFC theo đường chuẩn quercetin, mẫu được đo ở bước sóng 510 nm. Pha loãng quercetin (flavonoid chuẩn) bằng methanol đạt các nồng độ 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg QE/ml và pha loãng cao tổng cũng bằng methanol. Các dung dịch NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%, NaOH 1M được pha loãng bằng nước cất ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được định mức 5 ml, trước tiên thêm vào 2 ml nước cất, 0,5 ml quercetin và 0,15 ml NaNO₂ 5% lắc đều và giữ trong 5 phút, sau đó tiếp tục thêm 0,15 ml AlCl₃ 10% và giữ trong 6 phút. Tiếp tục cho thêm 1 ml NaOH 1M và 1,2 ml nước cất, lắc nhẹ và giữ trong 30 phút. Sau đó hỗn hợp được đo độ hấp thụ quang ở 510 nm. Mẫu dịch chiết được pha ở nồng độ thích hợp và thực hiện phản ứng tương tự quercetin. Xây dựng đường chuẩn quercetin dạng: $y = ax + b$, R^2 , với y là giá trị OD. Từ đường chuẩn, tính được hàm lượng flavonoid tổng số của mẫu cần xác định theo phương trình (1).

$$TFC = \frac{\left(\frac{m_1}{n} \cdot c\right)}{\left(1 - \frac{N}{100}\right) \cdot m_2} \quad (1)$$

Trong đó: TFC là hàm lượng flavonoid tổng số (mg QE/g dược liệu khô);

m_1 : khối lượng cao tổng (mg);

c: là giá trị x được xác định từ phương trình đường chuẩn $y = ax + b$;

n: nồng độ cao tổng phản ứng (mg/ml);

N: độ ẩm nguyên liệu khô (%);

m_2 : khối lượng nguyên liệu trích ly.

2.6. Tinh sạch flavonoid từ cao chiết tổng

Sử dụng phương pháp sắc kí cột phân đoạn, trong đó cột XAD-2 có kích thước Ø1,2 x 50 cm, kích thước hạt 0,3-1,25 mm. Pha 2ml dịch cao tổng, nồng độ 50 mg/ml methanol. Lựa chọn hệ dung môi rửa giải là ethylacetat: acid acetic: acid formic: nước (10:1:1:2). Tỷ lệ dịch : dung môi rửa giải là 1 : 30 (v : v). Thu ba phân đoạn (khoảng 20 ml mỗi phân đoạn, có sự khác biệt về màu sắc), xác định hàm lượng flavonoid trong từng phân đoạn, từ đó tính được độ tinh sạch của flavonoid trong từng phân đoạn.

2.7. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao tổng và flavonoid sau tinh sạch

Xác định vòng vô khuẩn bằng phương pháp Kirby-Bauer [16]. Dùng penicillin làm kiểm chứng dương cho ATCC 13061 và ATCC 33591, dùng gentamycin làm kiểm chứng dương cho các chủng còn lại. Pha loãng cao tổng bằng nước cất với nồng độ 25 mg/ml. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp pha loãng canh trường Broth [17]. Dải nồng độ khảo sát từ 25 mg/ml và giảm đều nồng độ đi 2,5 mg/ml. Để sau 24h, đo giá trị OD, xác định nồng độ MIC.

2.8. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao tổng và flavonoid sau tinh sạch

Sử dụng phương pháp DPPH để xác định hoạt tính chống oxy hóa. Quy trình dựa trên thí nghiệm của Basu và cộng sự [18]. Chuẩn bị dung dịch gốc DPPH 0,1 mM trong methanol tuyệt đối. Xây dựng đường chuẩn axit ascorbic (VTM C, vitamin C) bằng cách pha loãng VTM C trong methanol đến các dải nồng độ 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ; 12,5; 15,0 µg/ml. Tiếp theo cho 1 ml dung dịch VTM C và 2 ml DPPH 0,1 mM phản ứng trong 30 phút, tiến hành đo độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 517 nm với lần lượt các nồng độ đã pha. Mẫu đối chứng thay VTM C thành methanol. Tính phần trăm quét gốc tự do theo công thức (2):

$$P_{OXH} (\%) = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100\% \quad (2)$$

Trong đó: A_o là kết quả OD của mẫu đối chứng;

A_x là kết quả OD của mẫu phân tích;

P_{OXH} là phần trăm quét gốc tự do DPPH;

Từ giá trị P_{OXH} tiến hành dựng đường chuẩn vitamin C, tính giá trị IC_{50} .

Tiến hành đo tương tự với mẫu thí nghiệm. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng cách so sánh giá trị IC_{50} của các mẫu. Giá trị IC_{50} càng thấp tương ứng với hoạt tính chống oxy hóa càng cao và ngược lại.

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016, sai số cho phép nhỏ hơn 0,05, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Điều kiện trích ly flavonoid tổng số

Kết quả định lượng flavonoid tổng số (TFC) được tính theo phương trình: $y = 0,0003x + 0,0055$, $R^2 = 0,9946$. Các mẫu bao gồm ngâm chiết với methanol (MN), ngâm chiết với ethanol (EN), chiết soxhlet với methanol (MS) và chiết soxhlet với ethanol (ES). Các giá trị cao tổng (cao khô tổng) thu được trong các bảng kết quả là khối lượng cao tổng sau khi sấy khô đến độ ẩm $10,50 \pm 0,55$ %. Ảnh hưởng của dung môi và phương pháp trích ly đến hàm lượng cao tổng và flavonoid tổng thu được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp và dung môi trích ly đến hiệu suất trích ly

	MS (4 ^h)	MN (48 ^h)	ES (4 ^h)	EN (48 ^h)
Cao tổng (mg)	207,70 ± 1,51	95,23 ± 1,13	75,57 ± 0,77	36,27 ± 1,31
TFC/chất khô (mg/g)	0,32 ± 0,01	2,29 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,22 ± 0,01

Hàm lượng flavonoid tổng số thu được dao động từ 0,15 đến 2,29 mg QE/g chất khô nguyên liệu. Với cùng một điều kiện trích ly, dung môi methanol cho hiệu suất trích ly cao hơn so với ethanol. Ngâm chiết thu được lượng cao tổng ít hơn khoảng 2,7 lần so với chiết soxhlet, tuy nhiên ngâm chiết lại cho hiệu suất trích ly TFC lại cao hơn lần lượt là 7,16 và 8,13 lần với dung môi methanol và ethanol. Từ các kết quả này, lựa chọn ngâm mẫu khô trong methanol là điều kiện trích ly phù hợp.

Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng đồng thời của phương pháp và thời gian trích ly đến lượng cao tổng và TFC thu được. Thấy rằng TFC thu được dao động từ 0,21 đến 2,29 mg QE/g chất khô nguyên liệu. Lượng cao tổng thu được tăng dần theo thời gian chiết, tuy nhiên từ 48 giờ đến 72 giờ ngâm, tốc độ chiết đã giảm rõ rệt so với trước đó.

Bảng 2. Ảnh hưởng của phương pháp và thời gian trích ly đến hiệu suất trích ly

	MS-3 giờ	MS-4 giờ	MS-5 giờ	MN-24 giờ	MN-48 giờ	MN-72 giờ
Cao tổng (mg)	186,90 ± 1,07	207,70 ± 1,51	227,93 ± 0,97	34,53 ± 0,37	95,23 ± 1,13	98,28 ± 0,64
TFC/chất khô (mg/g)	0,21 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,53 ± 0,02	2,29 ± 0,01	2,14 ± 0,01

Với cùng điều kiện ngâm chiết, mẫu ngâm trong 48 giờ cho hiệu suất trích ly tốt hơn so với mẫu ngâm trong 24 giờ và 72 giờ. Từ 24 giờ đến 48 giờ cao tổng tăng 2,76 lần, trong khi đó hiệu suất trích ly TFC tăng 4,32 lần. Sau đó, mặc dù lượng cao tổng thu được ở 72 giờ cao hơn 48 giờ nhưng TFC lại thấp hơn. Điều này có thể giải thích do thời gian ngâm chiết kéo dài một phần các chất polyphenol trong đó có flavonoid đã bị biến đổi. Với phương pháp chiết soxhlet, mẫu chiết trong 4 giờ cho hiệu suất trích ly tốt hơn so với mẫu chiết trong 3 giờ và không có sự khác biệt với mẫu 5 giờ. Có thể thấy ngâm chiết trong 48 giờ cho hàm lượng flavonoid tổng số cao gấp 7 lần so với phương pháp chiết soxhlet trong 4 giờ. Từ các kết quả này, lựa chọn được phương pháp trích ly phù hợp là ngâm chiết, và thời gian trích ly là 48 giờ.

Trong thực tế, tỷ lệ nguyên liệu : dung môi luôn ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly các hợp chất tự nhiên từ nguyên liệu có nguồn gốc thực vật. Sử dụng phương pháp ngâm chiết trong 48 giờ để khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ đó đến hiệu suất trích ly TFC. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến hiệu suất trích ly flavonoid tổng số

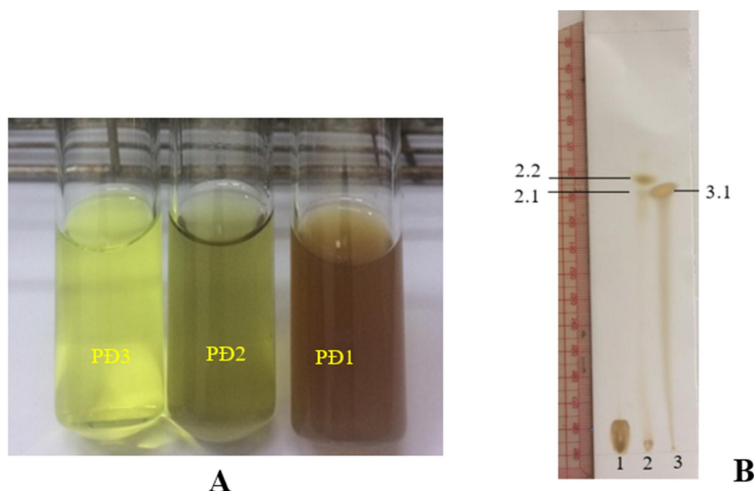
	MN(1:15)	MN(1:20)	MN(1:25)	MN(1:30)
Cao tổng (mg)	46,85 ± 0,82	95,23 ± 1,13	101,29 ± 0,38	101,46 ± 0,59
TFC/chất khô (mg/g)	0,86 ± 0,01	2,29 ± 0,01	2,22 ± 0,01	2,22 ± 0,01

Thấy rằng, TFC thu được dao động từ 0,86 đến 2,29 mg QE/g chất khô nguyên liệu. Trong đó, mẫu ngâm chiết với tỷ lệ dung môi trích ly là 1:20 (w:v) cho TFC cao nhất. Khi tăng tỷ lệ dung môi lên TFC thay đổi không đáng kể. Bên cạnh đó có thể thấy ở các tỷ lệ 1:20, 1:25 và 1:30 lượng cao tổng thu được tăng lên không đáng kể. Điều đó chứng tỏ quá trình trích ly đã tới hạn và việc tăng thêm dung môi không có ý nghĩa.

Từ các kết quả trên, lựa chọn được các điều kiện trích ly TFC phù hợp là ngâm chiết bằng dung môi methanol với tỷ lệ nguyên liệu : dung môi là 1:20 (w:v), ở nhiệt độ phòng, trong 48 giờ. Kết quả thu được hàm lượng flavonoid tổng số là 2,29±0,004 mg QE/g chất khô nguyên liệu. Nghiên cứu của Susylowati khi trích ly lá cúc tần tươi thu được TFC 4,19 mg QE/g chất khô nguyên liệu [11], kết quả đó cao gấp 2 lần so với kết quả trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, Andarwulan trích ly lá cúc tần chỉ cho TFC 0,0639 mg QE/g chất khô nguyên liệu [19], ít hơn 35 lần so với nghiên cứu này. Sự khác biệt đó có thể được giải thích do sự khác nhau về điều kiện sinh sống của cây cúc tần sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid có trong cây [20]. Điều kiện trích ly cũng là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hàm lượng flavonoid thu được. Bên cạnh đó mỗi bộ phận của cây cũng có sự khác nhau về hàm lượng flavonoid, vật liệu là mẫu khô hoặc mẫu tươi cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng flavonoid dù ở cùng một điều kiện trích ly [12].

3.2. Tinh sạch flavonoid từ cao chiết tổng

Cao chiết tổng có thể chứa nhiều loại flavonoid khác nhau, do đó cần thiết phải tinh sạch để đánh giá hoạt tính của chúng. Cao chiết tổng được hòa tan hoàn toàn trong methanol (100 mg/2ml) sau đó được cho vào cột và tiến hành chạy sắc kí ở áp suất thường. Sau khi chạy thu được 3 phân đoạn, mỗi phân đoạn khoảng 20 ml có màu sắc khác nhau (hình 2). Dịch chiết từ các phân đoạn được tiến hành kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng với pha động ethylacetat: acid acetic: acid formic: nước (10:1:1:2). Kết quả trên hình 2 cho thấy phân đoạn 2 có hai vạch 2.1 và 2.1 với R_f tương ứng là 0,61 và 0,65, phân đoạn 3 có một vạch 3.1 với R_f là 0,61.



Hình 2. Các phân đoạn flavonoid thu được bằng sắc ký cột. A - dịch thu được từ các phân đoạn, B - kết quả sắc ký bản mỏng của dịch từ các phân đoạn

Hàm lượng flavonoid trong từng phân đoạn được thể hiện trong bảng 4. Tổng lượng flavonoid trước khi qua cột 36,22 mg, sau khi qua cột thu được 29,27 mg, như vậy hiệu suất thu hồi flavonoid tổng số đạt $80,82 \pm 2,73$ %.

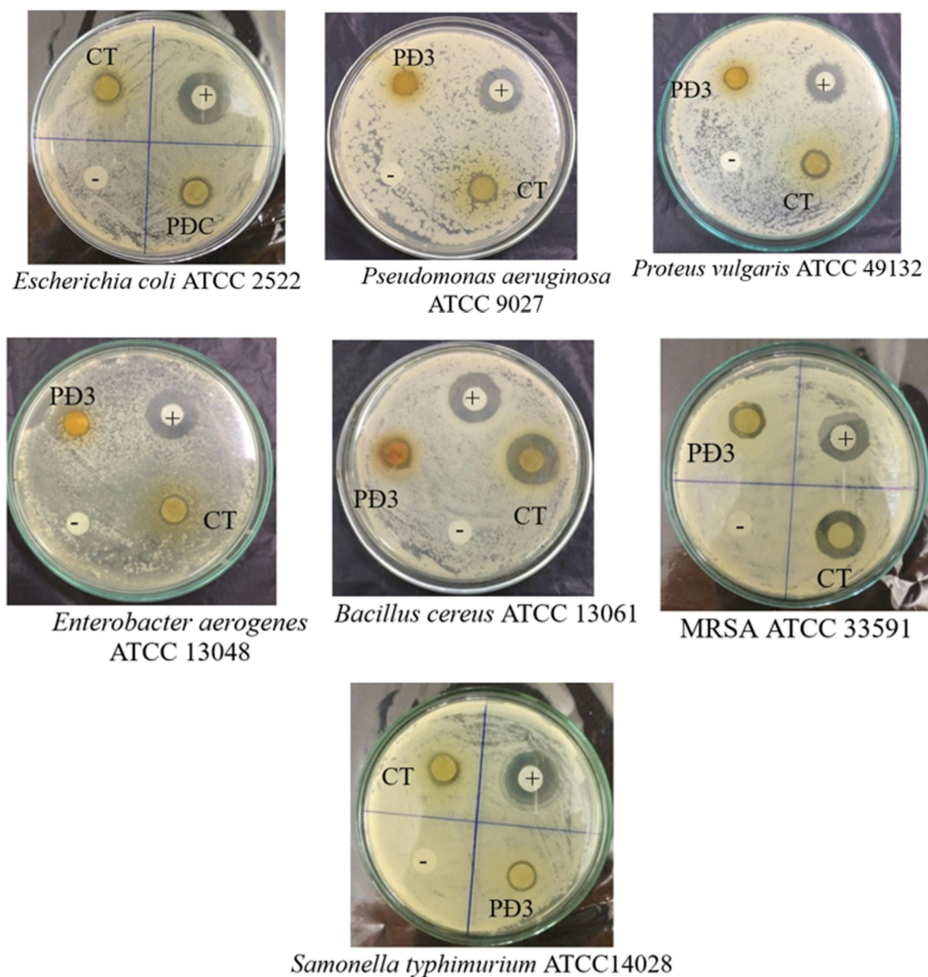
Bảng 4. Hàm lượng flavonoid trong từng phân đoạn sau sắc ký cột

Phân đoạn	Cao khô (mg)	TFC (mg)	TFC phân đoạn/cao khô phân đoạn (%)	TFC phân đoạn/TFC (%)
Phân đoạn 1	$44,23 \pm 1,46$	$2,10 \pm 0,11$	$4,76 \pm 0,38$	$7,2 \pm 0,4$
Phân đoạn 2	$19,10 \pm 1,12$	$0,26 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,29$	$0,9 \pm 0,2$
Phân đoạn 3	$35,43 \pm 0,07$	$26,91 \pm 0,90$	$75,93 \pm 1,46$	$91,9 \pm 3,1$

Có thể nhận thấy trong cả 3 phân đoạn đều có chứa flavonoid, tuy nhiên 91,9% lượng flavonoid tập trung ở phân đoạn 3. Trong khi đó, ở phân đoạn 2 chỉ có gần 1% hàm lượng flavonoid và phân đoạn 1 chỉ có hơn 7% hàm lượng flavonoid, mặc dù lượng cao tổng ở hai phân đoạn này chiếm tới gần 63% tổng lượng cao. Như vậy độ tinh sạch của flavonoid trong phân đoạn 3 là cao nhất đạt $75,93 \pm 1,46$ %.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn

Hiện nay, việc ứng dụng các hợp chất tự nhiên để thay thế kháng sinh có ý nghĩa rất quan trọng trong bối cảnh ngày càng xuất hiện nhiều loại vi sinh vật kháng kháng sinh. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cao tổng và dịch chiết từ phân đoạn 3 được thể hiện ở hình 3 và bảng 5.



Hình 3. Vùng vô khuẩn của cao tổng và dịch chiết phân đoạn 3 ở nồng độ 25 mg/ml (- kiểm chứng âm, + kiểm chứng dương, CT - cao tổng, PĐ3 - phân đoạn 3)

Dịch chiết ở các phân đoạn 1 và 2 hầu như không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn nên kết quả không thể hiện trong bảng 5. Từ bảng 5 có thể thấy cao tổng và dịch chiết phân đoạn 3 đều có khả năng kháng khuẩn ở mức độ khác nhau.

Bảng 5. Kết quả xác định vòng vô khuẩn của cao tổng và dịch chiết phân đoạn 3

Mẫu chất Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
	Penicillin (5µg/ml)	Gentamycin (300µg/ml)	Nước cất (kiểm chứng âm)	Cao tổng (CT) (25 mg/ml)	Phân đoạn 3 (PĐ3) (25 mg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	8,5 ± 0,5	-	0	8,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5
MRSA ATCC 33591	8 ± 0,0	-	0	7,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5

Mẫu chất Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
	Penicillin (5µg/ml)	Gentamycin (300µg/ml)	Nước cất (kiểm chứng âm)	Cao tổng (CT) (25 mg/ml)	Phân đoạn 3 (PD3) (25 mg/ml)
<i>Samonella typhimurium</i> ATCC14028	-	8,5 ± 0,5	0	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2522	-	8,5 ± 0,5	0	3,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	7,5 ± 0,5	0	2,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	7,5 ± 0,5	0	3,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 49132	-	6,5 ± 0,5	0	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5

Ghi chú: Dấu “-” không xác định

Từ kích thước vòng vô khuẩn, thấy rằng hoạt tính kháng khuẩn của cao tổng tốt hơn so với phân đoạn 3. Điều này có thể giải thích là do tác động cộng gộp của nhóm các chất có hoạt tính sinh học lên một đối tượng cụ thể. Một số loại flavonoid có thể tăng cường hoạt tính khi cùng tồn tại trong một hỗn hợp. Khả năng ức chế ATCC 13061 và ATCC 33591 của cao tổng và phân đoạn 3 tốt hơn so với các chủng còn lại. Từ đây, lựa chọn hai chủng này để xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) của cao tổng. Kết quả xác định MIC của cao tổng được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát nồng độ MIC

Nồng độ cao tổng (mg/ml)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061		MRSA ATCC 33591	
	Giá trị OD1	ΔOD1	Giá trị OD2	ΔOD2
0,0	0,456 ± 0,004		0,569 ± 0,005	
2,5	0,290 ± 0,002	0,166	0,427 ± 0,011	0,142
5,0	0,260 ± 0,007	0,030	0,378 ± 0,003	0,049
7,5	0,207 ± 0,007	0,053	0,254 ± 0,008	0,124
10,0	0,106 ± 0,007	0,101	0,131 ± 0,003	0,123
12,5	0,077 ± 0,007	0,030	0,078 ± 0,002	0,054
15,0	0,057 ± 0,003	0,020	0,037 ± 0,002	0,040
17,5	0,041 ± 0,006	0,016	0,037 ± 0,002	0,001
20,0	0,042 ± 0,003	0,000	0,034 ± 0,002	0,003
22,5	0,038 ± 0,002	0,004	0,029 ± 0,002	0,004
25,0	0,036 ± 0,004	0,002	0,025 ± 0,002	0,004

Từ bảng 6 thấy rằng, khi tăng nồng độ cao tổng lên thì giá trị OD giảm xuống, chứng tỏ nồng độ cao tổng càng cao thì khả năng ức chế ATCC 13061 và ATCC 33591 càng lớn. Tại giá trị mà OD bắt đầu giảm rất chậm chính là nồng độ nhóm chất kháng khuẩn trong cao tổng đã ức chế sự phát triển của chủng một cách tốt nhất có thể, đây chính là giá trị MIC cần tìm. Từ bảng kết quả thấy giá trị MIC của cao tổng đối với hai chủng ATCC 13061 và ATCC 33591 đều là 12,5 mg/ml.

Trên thế giới cũng đã có nghiên cứu chứng minh hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết giàu phenolic từ lá cúc tần, tuy nhiên chưa tìm thấy nghiên cứu xác định được đặc tính kháng khuẩn của từng flavonoid sau tinh sạch. Theo Rawinipa và cộng sự, dịch chiết từ lá cúc tần tươi Ấn Độ chứa các hợp chất phenolic có khả năng ức chế *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) với MIC lần lượt là 33,07; 16,54; 33,07 mg/ml nhưng không có khả năng ức chế *Escherichia coli* (ATCC 8739) và *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) [12]. Trong khi đó dịch chiết từ lá cúc tần khô chỉ có khả năng ức chế *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) và *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) với MIC là 83,04 và 41,52 mg/ml. Dịch chiết từ rễ cây cúc tần tươi có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với MIC từ 0,16 đến 5,12 mg/ml. Các kết quả này tuy có sự sai khác với kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi về giá trị MIC và chủng vi sinh vật kiểm định, nhưng đều khẳng định khả năng kháng khuẩn của dịch chiết chứa phenolic từ lá cúc tần.

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của một hợp chất tự nhiên là một hoạt tính quan trọng, từ hoạt tính này có thể dự đoán và định hướng việc ứng dụng hợp chất đó một cách thích hợp. Kết quả hoạt tính chống oxy hóa của cao tổng và các phân đoạn sau sắc ký được thể hiện ở bảng 7 thông qua giá trị IC_{50} .

Bảng 7. Khả năng quét 50% gốc tự do DPPH (IC_{50}) của cao tổng và mẫu sau các phân đoạn

Mẫu	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
VTMC	$8,24 \pm 0,19$
Cao tổng	$22,69 \pm 1,08$
Phân đoạn 1	$19,80 \pm 0,38$
Phân đoạn 2	$13,95 \pm 0,21$
Phân đoạn 3	$5,34 \pm 0,03$

Từ bảng 7 có thể thấy cả cao tổng và các mẫu flavonoid sau tinh sạch đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa. Trong đó mẫu phân đoạn 3 có giá trị IC_{50} nhỏ nhất, nhỏ hơn giá trị IC_{50} của chất chuẩn, cao tổng, phân đoạn 1 và phân đoạn 2 lần lượt là 1,54 lần, 4,25 lần, 3,71 lần và 2,61 lần. Kết quả hoạt tính chống oxy hóa của phân đoạn 3 rất đáng chú ý, gợi mở cho các nghiên cứu tiếp theo về cấu trúc flavonoid có trong phân đoạn này để giải thích được tính chất chống oxy hóa đó.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chỉ ra được điều kiện thích hợp để trích ly flavonoid từ lá và cành cúc tần (*Pluchea indica* (L.) Less) hàm lượng flavonoid cao nhất đạt $2,29 \pm 0,01$ mg QE/gchất khô nguyên liệu. Đã tinh sạch được flavonoid đạt nồng độ cao nhất $75,93 \pm 1,46$ % bằng phương pháp sắc kí cột. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn cho thấy khả năng ức chế vi sinh vật của cao chiết tổng tốt hơn các phân đoạn sau tinh sạch. Nồng độ ức chế tối thiểu của cao tổng với hai chủng vi sinh vật *Bacillus cereus* ATCC 13061 và MRSA ATCC 33591 là 12,5 mg/ml. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch flavonoid cúc tần ở phân đoạn 3 sau tinh sạch tốt nhất trong ba phân đoạn, mạnh hơn gấp 4,25 lần so với dịch cao chiết tổng, và hơn 1,54 lần so với axit ascorbic. Hoạt tính chống oxy hóa của nhóm chất flavonoid có trong cúc tần là một hoạt tính đáng quan tâm và cần được nghiên cứu nhiều hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 2004, tr.685-686
2. Buapool D., Mongkol N., Chantimal J., Roytrakul S., Srisook E., Srisook K., *Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of Pluchea indica leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation*, J. Ethnopharm., 2013, **146**:495-504.
3. Sabrin R. M., Alaa A., Reem M., et al., *Phytoconstituents and pharmacological activities of Indian camphorweed (Pluchea indica): A multi-potential medicinal plant of nutritional and ethnomedicinal importance*, Molecules, 2022, **27**(8):2383-2432.
4. Cho J., Kao C., Chen C. M., Tseng C. N., Lee Y. Z., Liao L. J., Hong Y. R., *Crude aqueous extracts of Pluchea indica (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 2012, **12**:265-276.
5. Jingya R., Zheng Li, Jjeing Y., et al., *Bioactive constituents from the aerial parts of Pluchea indica Less*, Molecules, 2018, **23**:2104.
6. Noridayu A. R., Hii Y. F., Faridah A., Khozirah S., Lajis N., *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of Pluchea indica Less*, Inter. Food Res. J., 2011, **18**:925-929.
7. Biswas R., Dutta P. K., Achari B., Bandyopadhyay D., Mishra M., Pramanik K. C., Chatterjee T. K., *Isolation of pure compound R/J/3 from Pluchea indica (L.) Less. and its anti-amoebic activities against Entamoeba histolytica*, Phytomedicine 2007, **14**:534-537
8. Al-Harrasi A., Hussain H., Abba G., et al., *The genus Pluchea: phytochemistry, traditional uses, and biological activities*, in Chemistry & Biodiversity, 2013, **10**:1944-1971.
9. Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, Hoàng Thị Sim, Trương Thị Tố Chinh, *Triterpenoid và phytosterol từ lá cây cúc tần (Pluchea indica L.)*, Tạp chí Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2019, **35**(2):106-111.

10. Văn Thị Thanh Huyền, Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, *Thành phần sterol, glycerol ester và thiophen trong cành cây cúc tần (Pluchea indica L.) của Việt Nam*, Tạp chí Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2018, **34**(2):78-82.
11. Takarina N. D., SusyLOWATI D., *Phytochemistry screening and total flavonoid test on plants associated mangrove (Pluchea indica and Sesuvium portuculastrum Leaves) at Blanakan, Subang, West Java*, AIP Conference Proceedings 2168, 020084(2019).
12. Rawinipa S., Suchanya N., *Antioxidant and antibacterial activities of Indian Marsh Fleabane (Pluchea indica (L.) Less)*, Research and Technology Transfer Affairs Division, 2015, **20**(2):144-154.
13. Suriyaphan O., *Nutrition, health benefits and applications of Pluchea indica (L.) Less leaves*, Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, **41**(4):1-10.
14. Karak P., *Biological activities of flavonoids: An overview*, International Journal of Pharmaceutical Sciences and research, 2018, **10**(4):1567-1574.
15. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M., *Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables*, Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 2005, **40**(3):255-260.
16. Dunkelberg W. E., *Kirby-Bauer disk diffusion method*, American Journal of Clinical Pathology, 1981, **75**(2):273.
17. Wiegand I. et al., *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*, Nature protocols, 2008, **3**(2):163-175.
18. Basu S., Sen A., Das M., et al., *Phytochemical evaluation and in vitro study of antioxidant potency of Amorphophallus campanulatus, Alocasia indica and Colocasia esculenta: A comparative analysis*, International Journal of Pharma. and Bio. Sciences., 2012, **3**(3):170-180.
19. Andarwulan D. K. N., Riza A. A., Hardianzah R., et al., *Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetable*, Journal of functional foods, 2012, **4**:339-347.
20. Soemarno Y., Bagyo Y., Amin S. L., *Total phenolic and flavonoid contents of pluchea indica less leaves extracts from some altitude habitats*, International Journal of Chem. Tech. Research, 2015, **8**(4):1618-625.

Nhận bài ngày 29 tháng 7 năm 2022

Phản biện xong ngày 19 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 18 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

⁽²⁾ Viện nghiên cứu quân nhu, Cục Quân nhu

⁽³⁾ Trường Đại học Việt Nhật

Liên hệ: Nguyễn Trường Giang

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Điện thoại: 0964192119; Email: giang.nguyentruongl@hust.edu.vn