

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP THÀNH PHẦN VÀ HOẠT TÍNH CỦA CÁC CURCUMINOIT TRÍCH TỪ CỦ NGHỆ VÀNG (*CURCUMA LONGA* L.)

Đến Tòa soạn 28-7-2008

PHAN THỊ HOÀNG ANH*¹, LÊ XUÂN TIẾN¹, NGUYỄN THỊ MẠC PHƯỢNG¹,
TRẦN THỊ VIỆT HOA¹, TRẦN VĂN SUNG², PHAN THANH SƠN NAM¹

¹Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

²Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ABSTRACT

Curcuminoid extracted from yellow turmeric is a mixture of 3 constituents: curcumin, demethoxycurcumin (DMC) and bis-demethoxycurcumin (BDMC). Previous published papers mainly concentrated on the biological activities of curcuminoid mixture. In this work, we have separated three constituents of curcuminoid, characterized and comparatively studied antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of these curcuminoids. Curcumin exhibited stronger DPPH scavenging activity ($IC_{50} = 55.083$) than the mixture, DMC, BDMC and the reference antioxidant, trolox. Meanwhile, the mixture showed the antibacterial property against *Staphylococcus aureus* (MIC = 62.5 mg/ml) better than each components. The mixture and its three constituents also demonstrated good abilities in suppressing the proliferation of Hep-G2 and RD cell-lines.

I - ĐẶT VẤN ĐỀ

Curcuminoid, thành phần chính trong củ nghệ vàng *Curcuma longa* L., từ lâu đã được biết đến có nhiều hoạt tính sinh học mạnh và đa dạng như hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng viêm, kháng ung thư... [1].

Curcuminoid thương mại trích từ nghệ hiện nay gồm 3 thành phần chính, curcumin [1,7-bis-(4-hydroxy-3-metoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione ~77%], demethoxycurcumin (DMC ~17%) và bis-demethoxycurcumin (BDMC ~3%) [1]. Đã có nhiều công trình nghiên cứu phân tách các thành phần trong hỗn hợp curcuminoid bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký cột (CC) [2 -8]. Tuy nhiên, các kết quả công bố đều cho độ phân giải thấp và độ tinh khiết của curcumin thu được chỉ khoảng 80%, và cũng chỉ dừng lại ở việc tách curcumin, chưa đề cập đến DMC và BDMC.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát phương pháp tách các thành phần trong hỗn hợp curcuminoid dựa vào TLC và CC. Các thành phần sau khi tách sẽ được kiểm tra độ tinh khiết bằng HPLC, đồng thời xác định cấu trúc bằng phổ MS, NMR. Hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng tế bào ung thư của các thành phần này cũng được nghiên cứu. Theo hiểu biết của chúng tôi, việc tách 3 thành phần trong hỗn hợp curcuminoid ở dạng tinh khiết, khảo sát và so sánh hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng tế bào ung thư của các thành phần trên chưa được công bố trước đây trong các tạp chí chuyên ngành trong nước.

II - THỰC NGHIỆM

1. Nguyên liệu

Bột curcuminoid thô mua của Viện Dược liệu, Bộ Y tế, Hà Nội.

Bản mỏng silicagel 60G F254 (Merck) cho sắc ký lớp mỏng và bột silicagel 60G F254 (Merck) 0,063 - 0,2 mesh cho sắc ký cột.

Các dung môi: metanol 99,9%, diclorometan 99,5%, cloroform 99,7%, axeton 99,7% (Shantou Vilong Chemical Factory).

2. Phương pháp nghiên cứu

Bột curcuminoit thô được kết tinh lại 3 lần trong hỗn hợp metanol : nước ở 60°C. Hỗn hợp sau kết tinh được lọc hút chân không thu được chất rắn 1. Nước cái đem cô quay dưới áp suất thấp thu được chất rắn 2.

Tách các thành phần trong chất rắn 1 và chất rắn 2 bằng sắc ký cột. Quá trình được thực hiện với cột silicagel 0,063 - 0,200 mesh, kích thước 13x85 cm, hệ dung môi giải ly được lựa chọn là CH₂Cl₂:metanol với độ phân cực tăng dần lần lượt là CH₂Cl₂:metanol = 100:0, 99,5:0,5, 99:1, 98:2, 95:5 và cuối cùng 90:10. Các phân đoạn hứng được kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng với hệ dung môi CH₂Cl₂:metanol 98:2, gộp chung những phân đoạn cùng R_f và cô quay loại dung môi.

Xác định cấu trúc và phân tích một số tính chất hóa lý các thành phần sau khi phân lập được:

Đo điểm chảy (trên máy Electrothermal 9100, thực hiện tại BM Hữu cơ, khoa Hóa học, Trường ĐHBK TP. HCM): Curcumin: 179,5 - 183,5°C; DMC: 166,1 - 170,5°C; BDMC: 213,2 - 215,5°C.

Đo phổ UV-Vis (máy đo JENWAY 6505 UV-Vis Spectrophotometer, thực hiện tại Bộ môn Hữu cơ, Khoa Hóa học, ĐHBK TP. HCM): λ_{max} của curcumin, DMC và BDMC lần lượt là 425, 418 và 414 nm.

Phân tích HPLC (thực hiện tại trung tâm Đào tạo và phát triển sắc ký, TP. HCM): cột sắc ký pha đảo C18 (250 x 4,6 mm, 5 cm), pha động axetonitril:H₃PO₄ 0,05% /55:45 (v/v), nhiệt độ cột 40°C, tốc độ dòng 0,8 ml/phút và đầu dò UV-Vis ở 422 nm: t_R của curcumin, DMC và BDMC lần lượt là 10,635; 9,462 và 8,616 phút.

Phổ MS đo trên máy HP 5989 MS Engine (Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ

Việt Nam): curcumin [M+H]⁺ = 369, BDMC [M+H]⁺ = 309, DMC [M+H]⁺ = 339.

Phân tích ¹H và ¹³C-NMR (thực hiện tại Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam), dung môi DMSO-d₆ đo trên máy Bruker AV 500, 500 MHz cho ¹H và 125 MHz cho ¹³C.

Hoạt tính kháng oxy hóa: (thực hiện tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. HCM)

Hỗn hợp curcuminoit ban đầu và các thành phần phân curcumin, DMC và BDMC thu được sau khi phân lập, định danh được khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH và định lượng MDA. Xác định % hoạt tính chống oxy hóa H₂CO% và IC₅₀.

$$H_2CO\% = [(OD_c - OD_T) / ODC] \times 100.$$

OD_c: Mật độ quang của chứng, OD_T: Mật độ quang của mẫu thử.

Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm: (thực hiện tại Bộ môn Vi sinh, ĐH Y Dược TPHCM)

Xác định hoạt tính kháng khuẩn với một số dòng vi khuẩn gram (+): *Streptococcus hemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, gram (-): *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteria*, và hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* theo phương pháp pha loãng trong bân thạch, ở các nồng độ hoạt chất 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 mg/ml, xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC.

Hoạt tính kháng ung thư: (thực hiện tại Phòng sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam).

Xác định hoạt tính kháng ung thư đối với 2 dòng tế bào Hep-G2 (*Hepatocellular carcinoma* - Ung thư gan) và RD (*Rhabdo sarcoma* - ung thư màng tim) được cung cấp bởi viện VSĐT TỰ.

Phương pháp xác định: Theo phương pháp của Skehan & CS (1990) và Likhwiwayawuid & CS (1993), chất chuẩn chứng dương tính: dùng chất chuẩn có khả năng diệt tế bào: Ellipiticin, Vinblastine hoặc Taxol pha trong DMSO.

Đọc trên máy ELISA ở bước sóng 495-515 nm, xác định CS% (% tế bào sống sót) và IC₅₀.

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả kết tinh curcuminoid thô trong hỗn hợp metanol : nước

Hiệu suất quá trình kết tinh khá thấp, khoảng 40%. Sắc ký bản mỏng cho thấy sau 3

lần kết tinh đã loại phần lớn nhựa và BDMC, điều này cũng phù hợp với kết quả phân tích HPLC (bảng 1): hàm lượng curcumin sau kết tinh lần 3 tăng lên đáng kể (từ 72,52% mẫu thô đến 91,87% sau kết tinh), hàm lượng DMC và đặc biệt BDMC giảm rõ rệt, phần này chủ yếu nằm trong nước cái.

Bảng 1: Kết quả phân tích HPLC

	Curcuminoid ban đầu			Curcuminoid sau kết tinh		
	Curcumin	DMC	BDMC	Curcumin	DMC	BDMC
Diện tích pic	702334	147411	118729	1139909	93561	7329
% Diện tích	72,52	15,22	12,26	91,87	7,54	0,59

2. Kết quả sắc ký bản mỏng

Từ kết quả khảo sát 2 hệ dung môi $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{CH}_3\text{OH}$ và $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ với các tỉ lệ khác nhau, chúng tôi chọn hệ $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (98:2 v/v) là hệ dung môi tách tốt nhất 3 thành phần trong hỗn hợp curcuminoid với giá trị R_f của curcumin, DMC và BDMC lần lượt là 0,525; 0,313 và 0,188.

3. Kết quả tách bằng sắc ký cột

Kết quả cho thấy sắc ký cột với hệ dung môi đã chọn tách rất tốt các thành phần trong hỗn

hợp curcuminoid. Chất rắn sau kết tinh chủ yếu là curcumin (>77%), phần nhỏ DMC (~7%) và BDMC (~3,5%), còn trong nước cái, BDMC có hàm lượng lớn nhất ~39%, kế là DMC (~27%) và cuối cùng là curcumin (~17%).

4. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Độ dịch chuyển hóa học của 3 thành phần curcuminoid trong phổ ^1H và ^{13}C -NMR được trình bày trong bảng 2 và 3.

Bảng 2: Độ dịch chuyển hóa học trong phổ ^1H -NMR của curcuminoid

Vị trí	Curcumin	BDMC	DMC
1	6,06 (s, 1H)	6,04 (s, 1H)	6,05 (s, 1H)
2, 2'			
3, 3'	6,75 (d, $J_{\text{tran}}=16,0\text{Hz}$, 2H)	6,68 (d, $J_{\text{tran}}=16,0\text{Hz}$, 2H)	6,68 (d, $J_{\text{tran}}=16\text{Hz}$, 1H) 6,75 (d, $J_{\text{tran}}=16\text{Hz}$, 1H)
4, 4'	7,55 (d, $J_{\text{tran}}=16,0\text{Hz}$, 2H)	7,54 (d, $J_{\text{tran}}=16,0\text{Hz}$)	7,54 (d, $J_{\text{tran}}=16\text{Hz}$, 1H) 7,55 (d, $J_{\text{tran}}=16\text{Hz}$, 1H)
5, 5'			
6, 6'	7,31 (d, $J_{\text{meta}}=1,5\text{Hz}$, 2H)	7,56 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$)	7,56 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$) 7,31 (d, $J_{\text{meta}}=1,5\text{Hz}$, 1H)
7, 7'		6,82 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$, 2H)	6,82 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$, 1H)(*)
8, 8'			
9, 9'	6,8 (d, $J_{\text{ortho}}=8,0\text{Hz}$, 2H)	6,82 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$, 2H)	6,82 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$)
10, 10'	7,15 (dd, $J_{\text{ortho}}=8,0\text{Hz}$, $J_{\text{meta}}=1,5\text{Hz}$, 2H)	7,56 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$)	7,56 (d, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$) 7,14 (dd, $J_{\text{ortho}}=8,5\text{Hz}$, $J_{\text{meta}}=1,5\text{Hz}$, 1H)
OCH_3	3,84 (s, 6H)		3,84 (s, 3H)
8, 8'-OH	9,65 (s, 2H)	10,057 (s, 2H)	10,06 (s, 1H) 9,06 (s, 1H)

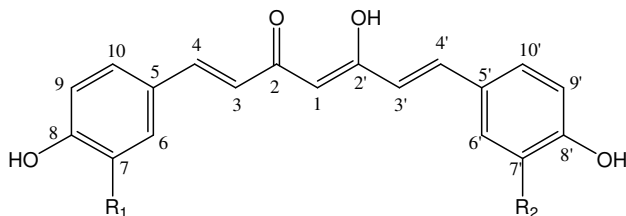
(*): độ dịch chuyển hóa học của ^1H tại vị trí C7.

Bảng 3: Độ dịch chuyển hóa học trong phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của curcuminoit

Vị trí	Curcumin	BDMC	DMC
1	100,841	100,927	100,91
2, 2'	183,206	183,200	183,28; 183,14
3, 3'	121,110	120,813	120,85; 121,08
4, 4'	140,707	140,363	140,38; 140,71
5, 5'	126,360	125,849	125,38; 126,38
6, 6'	111,375	130,314	130,33; 111,31
7, 7'	148,007	115,930	115,94; 148,03
8, 8'	149,358	159,788	159,80; 149,36
9, 9'	115,727	115,930	115,94; 115,73
10, 10'	123,110	130,314	130,33; 123,17
OCH ₃	55,708	100,927	55,72
8, 8'-OH			

Bảng 4: Bảng so sánh độ dịch chuyển hóa học trong phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của DMC với các số liệu công bố trong [8]

Vị trí	$^1\text{H-DMC}$ (theo [8])	$^1\text{H-DMC}$ theo phân tích	$^{13}\text{C-DMC}$ theo [8]	$^{13}\text{C-DMC}$ theo phân tích
1	6,02 (s, 1H)	6,05 (s, 1H)	100,9	100,91
2, 2'			183,2; 183,1	183,28; 183,14
3, 3'	6,67 (d, J=15,8Hz, 2H)	6,68 (d, J _{tran} =16Hz, 1H) 6,75 (d, J _{tran} =16Hz, 1H)	120,8; 121,1	120,85; 121,08
4, 4'	7,53 (d, J=15,8 Hz, 2H)	7,54 (d, J _{tran} =16Hz, 1H) 7,55 (d, J _{tran} =16Hz, 1H)	140,4; 140,7	140,38; 140,71
5, 5'			125,8; 126,4	125,38; 126,38
6, 6'	7,31 (d, J=1,6 Hz, 2H)	7,56 (d, J _{ortho} =8,5Hz, 1H) 7,31 (d, J _{meta} =1,5Hz, 1H)	130,4; 112,2	130,33; 111,31
7	-	6,82 (d, J _{ortho} =8,5Hz, 1H)	115,7; 148,0	115,94; 148,03
8, 8'	-		159,8; 149,8	159,80; 149,36
9, 9'	6,81 (d, J=8,3 Hz, 2H)	6,82 (d, J _{ortho} =8,5Hz, 2H)	115,9; 115,7	115,94; 115,73
10, 10'	7,13 (dd, J _{ortho} =8,3 Hz, J _{meta} = 1,6 Hz, 2H)	7,56 (d, J _{ortho} =8,5Hz, 1H) 7,14 (dd, J _{ortho} =8,5Hz, J _{meta} = 1,5Hz, 1H)	123,1; 123,2	130,33; 123,17
OCH ₃	3,82 (s, 3H)	3,84 (s, 3H)	55,7	55,72
8, 8'-OH	-	10,06 (s, 1H) 9,06 (s, 1H)		

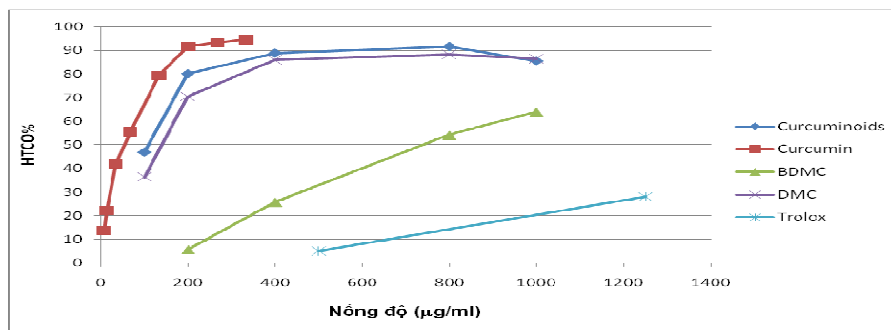


Curcumin: $R_1 = R_2 = OCH_3$
 BDMC : $R_1 = R_2 = H$
 DMC: $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

5. Kết quả xác định một số hoạt tính sinh học

a) Hoạt tính kháng oxy hóa

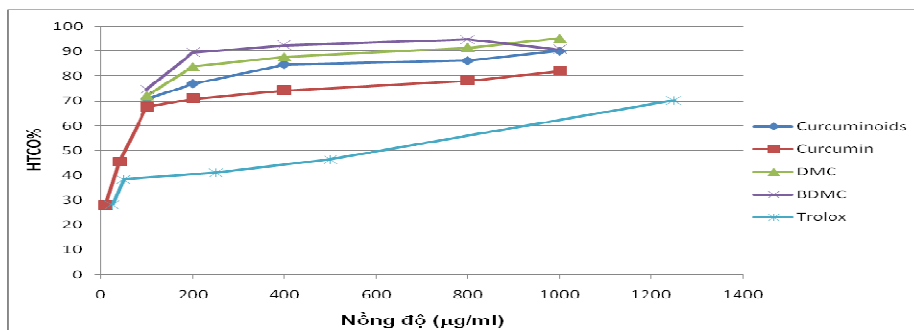
+ Hoạt tính kháng gốc tự do DPPH



Hình 4: Kết quả xác định hoạt tính kháng gốc tự do DPPH của hỗn hợp curcuminoid ban đầu, curcumin, DMC, BDMC và chất chứng trolox

Hình 4 cho thấy các thành phần phân lập được đều có hoạt tính kháng gốc tự do DPPH mạnh hơn chất chứng trolox, một dẫn xuất của vitamin E, cụ thể là : Curcumin ($IC_{50} = 53,5$ mg/ml) > hỗn hợp curcuminoid ($IC_{50} = 109,5$ mg/ml) > DMC ($IC_{50} = 134,8$ mg/ml) >> BDMC ($IC_{50} = 693$ mg/ml) > trolox.

+ Hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp MDA



Hình 5: Kết quả xác định hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp MDA

Kết quả cho thấy, hỗn hợp curcuminoid, curcumin, DMC và BDMC đều có hoạt tính kháng sự peroxide hóa lipid màng tế bào tương đương nhau và mạnh hơn so với trolox.

b) Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Hỗn hợp curcuminoid và các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm khá thấp với

các vi khuẩn đã khảo sát, chỉ có hoạt tính tương đối cao với *Staphylococcus aureus*, trong đó hoạt tính của hỗn hợp curcuminoid > DMC > BDMC ~ curcumin.

Bảng 5: Nồng độ ức chế tối thiểu MIC (mg/ml)

Vi khuẩn \ Hoạt chất	Curcumin	DMC	BDMC	Hỗn hợp curcuminoid
<i>Salmonella typhi</i>	> 1000	1000	1000	1000
<i>Shigella dysenteria</i>	> 1000	1000	1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	1000	1000
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	> 1000	1000	1000	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1000	125	1000	62,5
<i>Candida albicans</i>	1000	250	1000	250

c) Hoạt tính kháng tế bào ung thư

Bảng 6: Kết quả xác định CS% trong khảo sát hoạt tính kháng tế bào ung thư của curcumin, DMC, BDMC và hỗn hợp curcuminoid với 2 dòng tế bào Hep-G2 và RD

STT	Ký hiệu mẫu	T/C mẫu	Dòng tế bào - CS %		Kết luận
			Hep-G2	RD	
1	DMSO		100±0,0	100±0,0	
2	Chứng (+)	TK	3,5±0,01	2,2±0,0	Dương tính
3	Curcumin	TK	21,33±0,7	64,2±0,89	Dương tính với 1 dòng
4	Hỗn hợp curcuminoid	TK	20,8±0,1	43,75±0,89	Dương tính cả 2 dòng
5	BDMC	TK	11,2±0,5	31,7±1,3	Dương tính cả 2 dòng
6	DMC	TK	22,75±0,58	30,8±1,1	Dương tính cả 2 dòng

Bảng 7: Kết quả xác định giá trị IC₅₀

STT	Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào - IC ₅₀ (mg/ml)		Kết luận
		Hep-G2	RD	
2	Chứng (+)	0,3	0,175	Dương tính
3	Curcumin	2,919	>5	Dương tính với 1 dòng
4	Hỗn hợp curcuminoid	2,908	4,414	Dương tính cả 2 dòng
5	BDMC	2,508	3,88	Dương tính cả 2 dòng
6	DMC	3,025	2,469	Dương tính cả 2 dòng

Hỗn hợp curcuminoid và các thành phần có hoạt tính kháng ung thư đối với dòng tế bào Hep-G2 mạnh hơn so với dòng RD. So với 2 thành phần còn lại, curcumin có hoạt tính kháng ung thư thấp hơn với cả 2 dòng tế bào khảo sát. BDMC có hoạt tính kháng ung thư tốt nhất đối

với dòng Hep-G2, và DMC có hoạt tính kháng ung thư tốt nhất đối với dòng RD. Tuy nhiên hoạt tính kháng ung thư của hỗn hợp curcuminoid và các thành phần đối với các dòng tế bào khảo sát vẫn chưa cao so với các chất chứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bharat B. Aggarwal, Anushree Kumar, Manoj S. Aggarwal and Shishir Shishodia, *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*, 349 - 387, CRC Press (2005).
2. N. Janaki, & J. L. Bose. *Journal of the Indian Chemical Society*, 44(11), 985 - 986 (1967).
3. Y. N. Krishnamurthy, A. G. Mathew, E. S. Nambudiri, S. Shivashankar, Y. S. Lewis & C. P. Natarajan. *Tropical Science*, 18(37), 37 - 46 (1976).
4. V. S. Govindarajan. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12(3), 199 - 301 (1980).
5. A. Janben & T. H. Gole. *Journal of the Indian Chemical Society*, 44, 985 - 986 (1984).
6. T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi & S. Kawakishi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1609 - 1612 (1995).
7. K. Srinivasan, K. Sambaiah, & N. Chandrasekhara. *Food Chemistry*, 43, 271 - 274 (1992).
8. L. Péret-Almeida, A. P. F. Cherubino, R. J. Alves, L. Dufossé, M. B. A Glória, *Food Research International*, 38, 1039 - 1044 (2005).