

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHARANTIN, HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN *IN-VITRO* CỦA QUẢ MƯỚP ĐẮNG (*MOMORDICA CHARANTIA*) Ở THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Thị Hồng Yến, Nguyễn Việt Khấn

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định hàm lượng charantin, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn *in-vitro* của quả mướp đắng (*Momordica charantia*) ở Thừa Thiên Huế. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Quả mướp đắng được thu hái ở địa bàn Thừa Thiên Huế, sau đó được đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết, định lượng và thử hoạt tính. **Kết quả:** Hàm lượng charantin trong quả mướp đắng ở Thừa Thiên Huế được chiết bằng hỗn hợp dung môi MeOH-CHCl₃ (1:1 v/v) là 0,204%; hoạt tính chống oxy hóa theo hàm lượng FRAP của mẫu mướp đắng tươi chiết bằng dung môi methanol là 972,16 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$; hoạt tính kháng khuẩn có tác dụng trên cả 4 chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp với đường kính kháng khuẩn từ 14 – 17 mm. **Kết luận:** Quả mướp đắng ở Thừa Thiên Huế có hàm lượng Charantin cao, có hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn trên các chủng thường gặp đạt trung bình.

Từ khóa: Mướp đắng, charantin, chống oxy hóa, FRAP, kháng khuẩn.

Abstract

DETERMINATION OF CHARANTIN CONTENT, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY *IN-VITRO* OF THE BITTER MELON (*MOMORDICA CHARANTIA*) IN THUA THIEN HUE

Nguyen Thi Hong Yen, Nguyen Viet Khan

Department of Pharmacy, Hue University, of Medicine and Pharmacy

Background: To determine the charantin content, antioxidant and antimicrobial activity *in-vitro* of the bitter melon (*Momordica charantia*) in Thua Thien Hue.). **Materials and Methods:** Bitter melon fruit was collected in Thua Thien Hue province, then taken to the laboratory for extraction, quantitation and activity test. **Results:** Charantin content of bitter melon in Thua Thien Hue extracted with a solvent mixture of MeOH - CHCl₃ (1:1 v/v) was found to be 0.204%; antioxidant activity of FRAP content of fresh bitter melon extracted with solvent methanol was found to be 972.16 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$; the samples exhibited the antibacterial activity for four strains of bacterial pathogens with antimicrobial diameters from 14-17 mm. **Conclusion:** the charantin content of bitter melon fruit in Thua Thien Hue is high, the antioxidant and antibacterial activity are medium levels.

Key words: Bitter melon, charantin, antioxidants, FRAP, antibacterial.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mướp đắng còn gọi là Khổ qua, Lương qua, tên khoa học là *Momordica charantia* L., một cây leo mọc ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae). Nó không

những là món ăn phổ biến, bổ ích mà còn có nhiều tác dụng chữa bệnh như: kích thích tiêu hóa, tiêu viêm thoái nhiệt, có tác dụng phòng chống ung thư... đặc biệt có nhiều công trình nghiên cứu charantin trong mướp đắng có hiệu

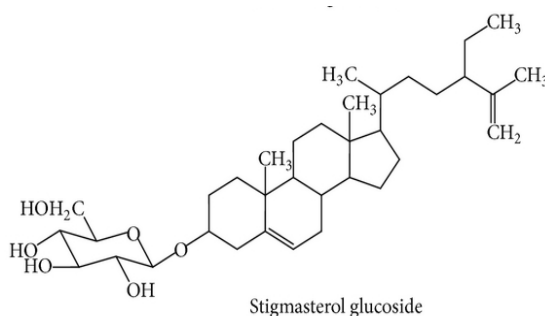
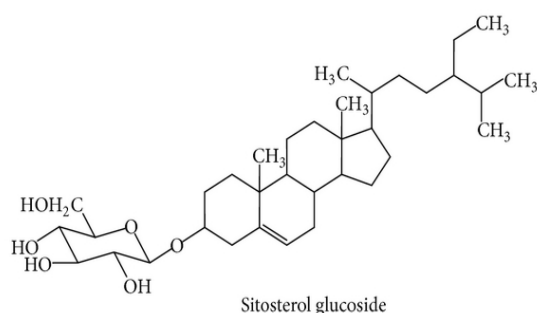
- Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Việt Khấn, email: nvietkhan@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2014.3.14

- Ngày nhận bài: 7/5/2014 * Ngày đồng ý đăng: 9/6/2014 * Ngày xuất bản: 10/7/2014

quả trong điều trị bệnh cao huyết áp, bệnh đái tháo đường [3,5].

Hiện nay, ở Việt Nam cũng như trên thế giới có nhiều loại mướp đắng khác nhau do điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu hoặc được lai tạo với mục đích tăng năng suất trái hoặc lai tạo để có trái to, ít đắng ứng dụng vào thực phẩm [7]. Trong đó, mướp đắng ở Thừa Thiên Huế nhiều gai, màu xanh đậm và có vị đắng hơn nhiều loại mướp đắng khác. Hiện nay có rất ít công trình nghiên cứu được liệu này ở Thừa Thiên Huế. Để góp phần tiêu chuẩn hóa chất lượng dược liệu theo WHO nói chung cũng như ở Việt Nam nói riêng, chúng tôi nghiên cứu xác định hàm lượng charantin (charantin là hỗn hợp gồm hai hoạt chất: sitosterol glucoside và stigmasterol glucoside), hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn *in-vitro* của quả mướp đắng ở tỉnh Thừa Thiên Huế.



Hỗn hợp hai hoạt chất sitosterol glucoside và stigmasterol glucoside của charantin

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Quả mướp đắng (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser), họ Bầu bí (Cucurbitaceae), được thu hái vào tháng 3 – 5 tại các địa phương trên địa bàn Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Xử lý mẫu: Quả mướp đắng tươi sau khi thu hái được xử lý sơ bộ: rửa sạch, bỏ hạt, cắt thành lát mỏng, để ráo nước, trộn đều và sau đó sấy ở nhiệt độ 60°C. Sau đó nghiền nhỏ và được chiết với ethanol và hỗn hợp dung môi MeOH – CHCl₃ (1:1 v/v) đến kiệt, cô loại bớt dung môi và định mức [5,7]. Một phần sấy đến khối lượng không đổi để xác định hàm ẩm.

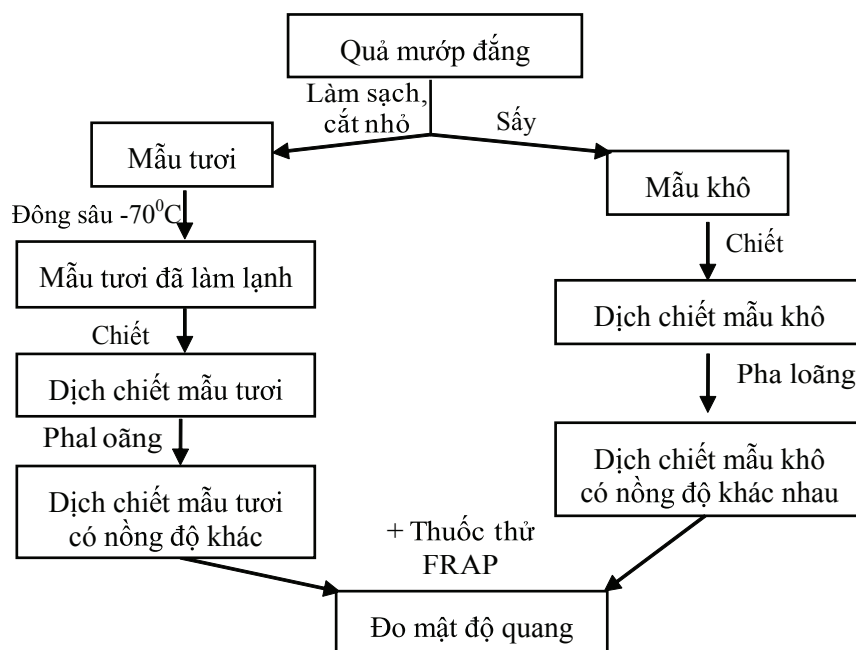
Điều kiện pha động: Sử dụng cột Zorbax C18 (150 x 4,6mm, 5µm); nhiệt độ cột: 50°C; tốc độ dòng: 1 ml/min; thể tích mẫu: 20µL, bước sóng dùng để định lượng: 204 nm; pha động: nước – acetonitrile chương trình gradient dung môi sau: 0 – 14 phút: 85 % ACN; 14 – 15 phút: 85 – 100% ACN; 15 – 22 phút: 100% ACN; 22 – 24: 100 – 85% ACN; 24 – 25 phút: 85% ACN.

Khoảng tuyến tính: Charantin chuẩn được cân và hòa tan trong dung môi hỗn hợp MeOH – CHCl₃ (1:1, v/v), pha dung dịch chuẩn ở các nồng độ: 31,4; 62,8; 125,5; 251; 502 µg/ml. Tiến hành sắc ký lần lượt từng dung dịch chuẩn, ghi diện tích peak và lập đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa diện tích peak của charantin với nồng độ tương ứng [5,7].

2.2.2. Phương pháp FRAP

Nguyên lý: Xác định hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp FRAP là phương pháp dựa vào sự khử phức Fe (III)–TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) thành phức Fe (II)–TPTZ bền hơn bằng một chất khử (chất chống oxy hóa) ở pH thấp có màu xanh dương đậm và có thể đo mật độ quang bằng quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis ở bước sóng λ_{max} = 595 nm. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá bởi sự tăng cường độ màu của phức Fe (II)–TPTZ (hàm lượng FRAP) [1,2].

Cách tiến hành: Sau khi thu mẫu trên địa bàn Thừa Thiên Huế, nguyên liệu được rửa sạch, để ráo nước, tách hạt, thái nhỏ, trộn đều và chia thành: một phần để tươi, một phần sấy khô ở 60°C và phần còn lại xác định hàm ẩm. Mỗi loại cân khoảng 10,0 g và được tiến hành theo sơ đồ 1 [1,6].



Sơ đồ 1. Các bước xác định hoạt tính chống oxi hóa của mẫu mướp đắng tươi và khô

Thuốc thử FRAP gồm: Dung dịch đệm acetat 300mM (pH = 3,6), 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ) trong 40 mM HCl, 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong nước cất; tỷ lệ các thành phần trong thuốc thử tương ứng là 10:1:1 theo thể tích. Dung dịch thuốc thử luôn được chuẩn bị mới (trong ngày) [1,2].

2.2.3 Phương pháp kháng sinh đồ

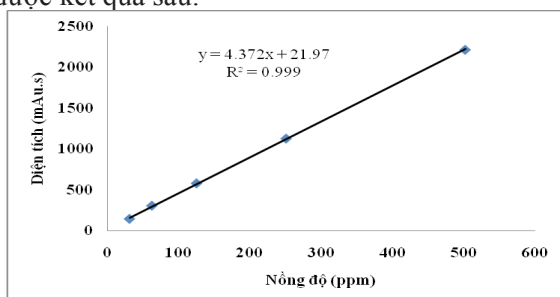
Thử nghiệm xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết theo phương pháp kháng sinh đồ trên các chủng vi khuẩn ATCC, ứng dụng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch đĩa.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Định lượng charantin bằng HPLC

Khoảng tuyến tính

Tiến hành thực nghiệm theo mục 2.2a, thu được kết quả sau:



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích peak và nồng độ charantin

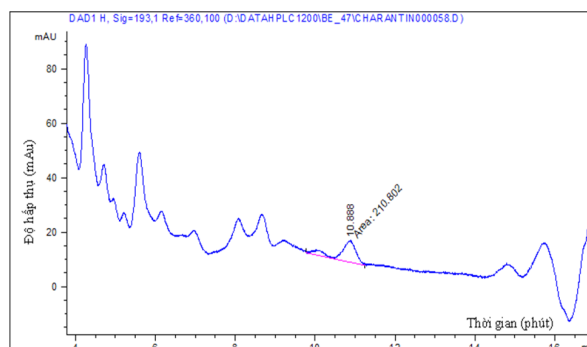
Từ Hình 1, phương trình hồi quy có dạng $y = 4,372x + 21,97$, hệ số tương quan $R^2 = 0,999$. Trong khoảng nồng độ đã khảo sát, diện tích peak thu được tương ứng từ các dung dịch chuẩn có tương quan tuyến tính chặt chẽ với nồng độ của chúng.

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Dựa vào đường chuẩn, xác định LOD và LOQ của phương pháp như sau: **LOD** = $3\delta/S = 8,25 \mu\text{g/ml}$ (ppm); **LOQ** = $10\delta/S = 27,50 \mu\text{g/ml}$ (ppm).

Định lượng charantin bằng HPLC

Sau khi mẫu được xử lý, lọc qua màng lọc 0,45 μm rồi được bơm vào máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1200 series, đầu dò DAD, cột Zorbax SB C18, thu được diện tích peak.



Hình 2. Diện tích peak charantin của mẫu mướp đắng

Từ đường chuẩn, hàm lượng của các mẫu thu được theo bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng charantin theo dung môi chiết

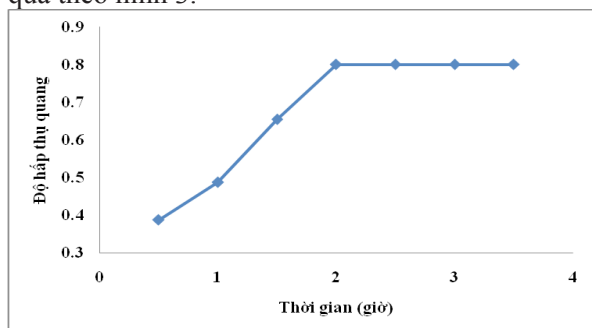
Dung môi chiết	Thí nghiệm	Hàm lượng (%)	Trung bình (%) $\pm$ SD
C_2H_5OH	1	0,181	0,181$\pm$0,006
	2	0,175	
	3	0,186	
$CH_3OH-CHCl_3$ tỷ lệ 1:1	1	0,202	0,204$\pm$0,003
	2	0,208	
	3	0,203	

So sánh sự khác biệt giữa hai giá trị trung bình hàm lượng charantin cho thấy ở mức ý nghĩa 0,05, kết quả phân tích từ hai hệ dung môi là khác nhau có ý nghĩa thống kê. Cấu tạo hai hoạt chất sitosterol glucoside và stigmasterol glucoside của charantin gồm một vòng đường liên kết với gốc hidrocarbon lớn, tính phân cực tương đối thấp, có khả năng được chiết hoàn toàn trong hệ dung môi $CH_3OH-CHCl_3$ tỷ lệ 1:1 [5]. Vì vậy, hàm lượng charantin trong quả mướp đắng chiết bằng hỗn hợp dung môi $CH_3OH-CHCl_3$ tỷ lệ 1:1 cao hơn dung môi C_2H_5OH .

3.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Khảo sát hàm lượng Fe^{2+} theo thời gian

Lấy 8,0 ml thuốc thử FRAP vừa chuẩn bị vào bình định mức 10 ml, thêm vào 1,00 ml dịch chiết, thêm methanol cho đến vạch. Đo quang tại bước sóng 595 nm sau 30 phút mỗi lần. Thu được kết quả theo hình 3.



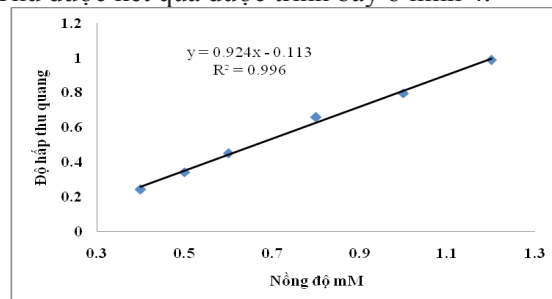
Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi hàm lượng Fe^{2+} theo thời gian

Các polyphenol và một số hợp chất trong dịch chiết mướp đắng phản ứng với thuốc thử xảy ra chậm có thể kéo dài trong vài giờ. Theo kết quả khảo sát, thời gian để phản ứng giữa dịch chiết và thuốc thử xảy ra hoàn toàn là 2,0 giờ; chọn thời gian 2,0 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xây dựng đường chuẩn

Pha các dung dịch Fe^{2+} chuẩn 400 mM, 500 mM, 600 mM, 800 mM, 1000 mM, 1200 mM, với

dung dịch FRAP trong dung môi methanol. Các dung dịch này được đo quang ở bước sóng 595 nm. Thu được kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ Fe^{2+}

Hình 4 cho thấy, phương trình hồi quy có dạng $y = 0,924x - 0,113$, hệ số tương quan $R^2 = 0,996$ thể hiện sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ hoạt chất với độ hấp thụ quang trong khoảng từ 0,2423 đến 0,9886 mmol Fe^{2+}/L .

Xác định hoạt tính chống oxy hóa của quả mướp đắng

Khảo sát dung môi

Các mẫu mướp đắng tươi được tiến hành theo sơ đồ 1 với dung môi khảo sát là nước và methanol. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa quả mướp đắng theo các dung môi

Mẫu	FRAP ($\mu\text{mol } Fe^{2+}/L$)	
	Nước	Methanol
1	933,21	972,81
2	934,72	970,54
3	934,07	977,57
4	932,88	973,46
5	934,50	966,11
6	935,05	972,49
Trung bình $\pm$ SD	934,07 $\pm$ 0,86	972,16 $\pm$ 3,76

Qua bảng 2, kết quả phân tích từ hai hệ dung môi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Cả hai loại dung môi này đều có thể hòa tan nhiều hợp chất polyphenol có tính oxy hóa mạnh. Tuy nhiên, methanol là dung môi có khả năng hòa tan được nhiều chất trong dược liệu, từ chất có độ phân cực yếu đến chất có độ

phân cực mạnh. Do đó, hoạt tính chống oxy hóa trong quả mướp đắng chiết bằng methanol cao hơn dung môi nước.

Khảo sát mẫu mướp đắng khô và tươi

Các mẫu mướp đắng khô và tươi được tiến hành theo sơ đồ 1 với dung môi methanol. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng FRAP của mẫu mướp đắng khô và mẫu mướp đắng tươi với dung môi methanol

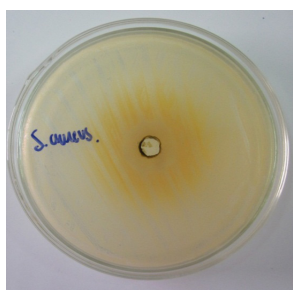
Mẫu	Hàm lượng FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$)	
	Mẫu khô	Mẫu tươi
1	802,96	972,81
2	802,85	970,54
3	804,36	977,57
4	805,12	973,46
5	804,04	966,11
6	806,09	972,49
Trung bình $\pm$ SD	804,24 $\pm$ 1,25	972,16 $\pm$ 3,76

Kết quả cho thấy, có sự khác biệt giữa hai giá trị FRAP trung bình của mẫu mướp đắng tươi và mẫu mướp đắng khô. Mướp đắng chứa một lượng khá lớn acid linoic, olenic, một lượng lớn vitamin C, flavonoid. Dưới tác động của nhiệt độ trong quá trình xử lý mẫu sẽ làm phân hủy hoặc chuyển hóa một số chất chống oxy hóa này. Vì vậy, sử dụng phương pháp “đông sâu” (được tiến hành dựa trên nguyên tắc làm đông khô mẫu thực vật, phá vỡ cấu trúc các tế bào đồng thời cộng với quá trình lắc tại máy lắc điều nhiệt 37°C) xử lý cho mẫu tươi

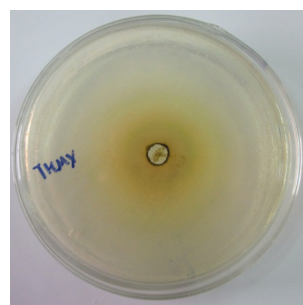
thu được giá FRAP (966,11 – 973,46 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$) cao hơn mẫu khô qua sấy (802,85– 806,09 ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$) [4].

3.3. Kết quả nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của quả mướp đắng

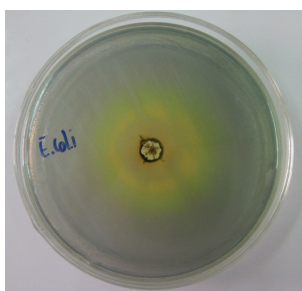
Sử dụng đĩa thạch vô khuẩn đã chuẩn bị sẵn. Cây trái mỗi chủng vi khuẩn lên mỗi đĩa thạch. Mỗi đĩa thạch đục 1 lỗ. Tổng cộng có 4 đĩa thạch thử nghiệm trên 4 chủng vi khuẩn ATCC. Nhỏ dịch chiết vào các lỗ thạch. Kết quả thể hiện ở các hình 5 đến 8 và bảng 4.



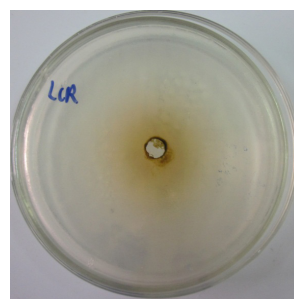
Hình 5. Vòng vô khuẩn của dịch chiết trên *S. aureus* ATCC



Hình 6. Vòng vô khuẩn của dịch chiết trên *P. aeruginosa* ATCC



Hình 7. Vòng vô khuẩn của dịch chiết trên *E. coli* ATCC



Hình 8. Vòng vô khuẩn của dịch chiết trên *Streptococcus D* ATCC

Bảng 4. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết quả mướp đắng

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>Streptococcus D</i> ATCC	17,0
<i>S. aureus</i> ATCC	15,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	14,0
<i>E. coli</i> ATCC	14,0

Từ kết quả trên cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của mướp đắng (*Momordica charantia*) đều có tác dụng trên cả 4 chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp. Đường kính vòng vô khuẩn khác nhau tùy thuộc chủng vi khuẩn. Tuy nhiên, nhìn chung hoạt tính kháng khuẩn của mướp đắng trên các chủng này vẫn chưa cao, do đó, việc tiếp tục nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng dịch chiết ý nghĩa thực tiễn sẽ không cao.

4. KẾT LUẬN

Hàm lượng charantin trong mướp đắng ở Thừa Thiên Huế là 0,204%.

Hoạt tính chống oxy hóa theo hàm lượng FRAP của mẫu mướp đắng là 972,16 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$.

Dịch chiết mướp đắng đều có tác dụng kháng khuẩn trên cả 4 chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp với đường kính kháng khuẩn từ 14 – 17 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asli Semiz and Alattin Sen (2007), Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (bitter melon) fruit extract, *African Journal of Biotechnology*, 6(3), pp. 273 - 277.
- Benzie I.F., Strain, J.J. (1996), "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": The FRAP assay", *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70 - 76.
- Grover J.K., Yadav S.P. (2004), *Pharmacological actions and potential uses of Momordica charantia: a review*, Science Direct, 93, pp. 123 - 132.
- Liu F.T., and Wang Z.T. (2000), *Antioxidative activity of natural products from plant*, Life Sciences, 66(8), pp. 709 – 723
- Okabe H., Miyahara Y., Yamauchi T., Miyahara K. and Kawasaki T. (1980), "Studies on the Constituents of *Momordica charantia* L.I. Isolation and Characterization of Momordicosides A and B, Glycosides of a Pentahydroxycucurbitane Triterpene", *Chem. Pharm. Bull.*, 28 (9), pp. 2753 - 2762.
- Ronald L.P., Xianli, W., and Karen S. (2005), "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *Agricultural and food chemistry*, 53(10), pp. 4290 - 4302.
- Sook Young Lee, Seok Hyun Eom, Yong Kyoung Kim, Nam Il Park and Sang Un Park, A review: "Cucurbitane-type triterpenoids in *Momordica charantia* Linn.", *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(13)*, pp. 1264-1269 (2009).