



NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CARPAIN TỪ LÁ ĐU ĐỦ (*CARICA PAPAYA CARICACEAE*)

Isolation of carpain from papaya leaves (*Carica papaya Caricaceae*)

Phan Thành Nhân¹, Vũ Thị Ngọc Thảo², Nguyễn Việt Đức^{3*}, Võ Thị Bạch Huệ⁴

^{1,2,3} Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam

⁴Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT. Bằng sắc ký cột nhanh, 200 mg hợp chất CP1 được phân lập từ 8 kg lá Đu đủ. Sau khi tách và tinh chế bằng sắc ký, dựa trên sắc ký lớp mỏng, MS, NMR, cấu trúc hợp chất CP1 đã được xác định. CP1 là carpain – một alkaloid chính trong lá Đu đủ với hoạt tính sinh học quan trọng. Thử hoạt tính kháng khuẩn cho thấy kết quả kháng khuẩn tốt của cả cao alkaloid toàn phần và alkaloid chính. Carpain được xác định là có hoạt tính kháng khuẩn đối với các vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

TỪ KHOẢ: carpain, đu đủ, kháng khuẩn

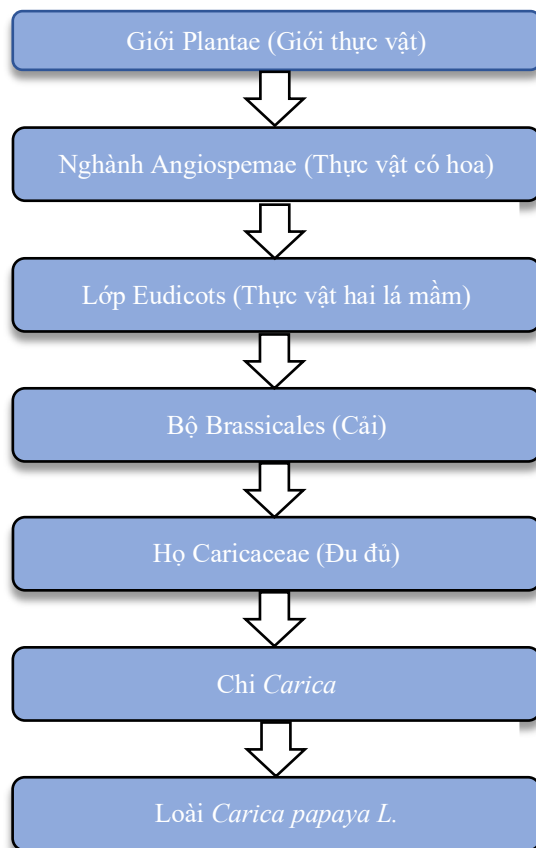
ABSTRACT. By flash column chromatography, 200 mg of CP1 are isolated from the chloroform extract of 8 kg of the dry - leaf of *Carica papaya* L. After demonstrated by chromatographic, spectrophotometric methods such as: TLC, UV – Vis, IR, MS, NMR. The structure of CL5-1 is elucidated and determined. CP1 is carpain- one of *Carica papaya* L. principal alkaloids with the important biological activities. Microbiological testing showed also the good positive results of this total extract and the principal alkaloid. Carpaine has moderate antibacterial activity on common pathogenic bacteria.

KEYWORDS: carpaine, *Carica papaya* L., antibacterial activity

1. GIỚI THIỆU

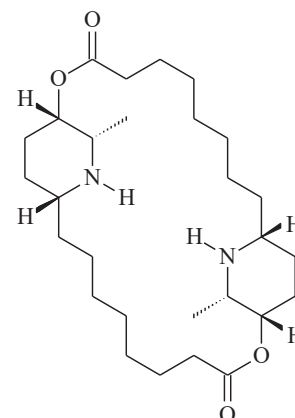
Đu đủ (*Carica papaya* Caricaceae) là một loại cây nhiệt đới phổ biến có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới Châu Mỹ. Cây được trồng phổ biến rộng rãi ở nhiều nơi ở Việt Nam, là loài duy nhất trong Chi đu đủ (*Carica*), thuộc Họ đu đủ (*Caricaceae* hay *Papayaceae*)[2].

như đầy bụng, khó tiêu, tiêu chảy, nhuận tràng, buồn nôn. Nghiên cứu chỉ ra rằng trong lá có rất nhiều Phytochemical cụ thể là alkaloid (carpain, pseudocarpain, macrocyclic piperidin, dehydrocarpaine I và II, nicotin,...); phenolic acid (protocatechic acid, coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, coumarin,...); flavonoids (kaempferol, quercetin, glycosylated flavonols: manghaslin, clitorin, nicotiflorin, rutin,...); tannins; saponin glycosid;... Ngoài ra, lá cây còn chứa nhiều vitamin (đặc biệt là A, B9, B12, C); các khoáng chất (Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn); các acid béo (linoleic acid, linolenic acid). Với các thành phần hóa học này cho các tác dụng dược lý như kháng khuẩn, kháng nấm, chống giun sán, chống tế bào ung thư, tăng hoạt động của các tế bào miễn dịch, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan, kháng viêm, hạ đường huyết, chống gout.[4].



Hình 1. Vị trí phân loại cây đu đủ

Lá cây được dùng ép ra lấy nước để điều trị các bệnh truyền nhiễm như sốt rét, sốt xuất huyết; các vấn đề tiêu hóa



Hình 2. Carpain

Received: May, 31, 2019

Accepted: July, 25th, 2019

*Corresponding Author

Email: vietducd11@gmail.com

Carpain được nghiên cứu cho thấy tác dụng kháng khối u in vitro, tác dụng kháng khuẩn kháng nấm và một số hoạt tính sinh học khác [1],[3].

Vì vậy, “Nghiên cứu phân lập carpain từ Lá đu đủ (*Carica papaya L.*, Caricaceae)” nhằm mục đích khảo sát các điều kiện chiết xuất và tối ưu hóa quá trình phân lập carpain, khảo sát tính kháng khuẩn trên một số chủng vi khuẩn thường gặp, tạo tiền đề nghiên cứu các tác dụng sinh học của lá đu đủ và alkaloid trong lá đu đủ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Lá đu đủ tươi (*Carica papaya L.*, Caricaceae) thu hái vào tháng 11 năm 2018 tại xã Tân Triều, huyện Vĩnh Cừ, tỉnh Đồng Nai.

Lá cây đu đủ tươi phải trưởng thành đạt kích thước từ cuống đến đỉnh lá khoảng 30 cm, được thu hái vào buổi sáng. Lá được rửa sạch, thái nhỏ lá ra rộng khoảng 1 cm, sấy trong tủ sấy ở 40 °C, sau đó xay nhỏ có kích thước 2 mm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Các phương pháp phân lập và xác định cấu trúc

2.2.2 Khảo sát điều kiện chiết được liệu

Nghiên cứu vi phẫu:

Chuẩn bị mẫu lá già tươi, cắt nhuộm và soi vi phẫu dưới kính hiển vi, ghi lại các đặc điểm cấu tạo vi phẫu của các bộ phận.

Nghiên cứu đặc điểm bột dược liệu:

Lá đu đủ được phơi khô, xay mịn, cho một ít bột dược liệu lên lam kính và soi dưới kính hiển vi và ghi nhận các đặc điểm của bột dược liệu.

Xác định độ ẩm:

Cân khoảng 2 g bột dược liệu, đo độ ẩm bằng tủ sấy MEMMERT, thực hiện 3 lần riêng biệt, lấy kết quả trung bình.

Xác định độ tro:

Cân khoảng 2 g bột dược liệu, tiến hành xác định độ tro toàn phần, thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình.

Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật trong lá đu đủ:

Dùng các phản ứng hóa học đặc trưng để nhận diện các hợp chất tự nhiên có trong lá đu đủ như alkaloid, flavonoid, coumarin, chất béo, tinh dầu,...

2.2.3 Nghiên cứu thành phần alkaloid trong lá đu đủ

Khảo sát quy trình chiết alkaloid toàn phần:

Làm ẩm 10 g lá đu đủ, cho vào bình ngâm kiệt, thêm vào mỗi bình 300 ml tương ứng với cồn 90%, cồn 70%, cồn 50%, ngâm trong 24 giờ, tiến hành rút dịch chiết. Gộp và cô đến cạn thu được 3 cao cồn 90%, 70%, 50%. Tính hiệu suất chiết các cao cồn.

Sắc ký lớp mỏng (SKLM): Tiến hành chạy SKLM với dung môi pha động cloroform - methanol (9:1, 2 giọt NH₃đđ). Kiểm tra bằng UV 254 nm, 365 nm và TT Dragendorff.

Từ hiệu suất và kết quả SKLM, xác định nồng độ cồn cho hiệu quả chiết alkaloid toàn phần tốt nhất để lựa chọn dung môi chiết.

Chiết cao toàn phần và cao alkaloid toàn phần:

Từ 8 kg bột lá đu đủ, tiến hành chiết cao toàn phần bằng phương pháp ngâm kiệt với cồn 70%, thay đổi pH và lắc phân bố với các dung môi n-hexan, cloroform thu được các cao phân đoạn.

Tiến hành chấm SKLM để kiểm tra alkaloid có trong 2 phân đoạn chiết này, phân đoạn nào có chứa nhiều alkaloid hơn thì tiến hành phân lập.

Tách các alkaloid từ cao alkaloid toàn phần bằng sắc ký cột chân không:

Dụng cụ là cột sắc ký có kích thước 4,5x50 cm với lưới thủy tinh xốp, bình erlen hút chân không thể tích 2 lít, ống nghiệm 200 ml, lọ thủy tinh đựng các phân đoạn, máy cô quay thu hồi dung môi. Sử dụng silica gel kích thước 40-63 µm nạp vào cột theo phương pháp cột khô, ổn định bằng dung môi nền dưới áp suất âm, lượng silica gel gấp 10 lần mẫu. Mẫu được trộn với 1 lượng vừa phải silica gel, nghiền mịn và sấy ở 40-50 °C đến khô. Khai triển cột đến khô nhờ áp suất hút, mỗi lần 100 ml pha động.

Tinh chế alkaloid:

Các phân đoạn đơn giản được loại hết dung môi, hòa lẫn trong dung môi thích hợp để loại các bột tạp. Sau đó kết tinh alkaloid trong các dung môi thích hợp. Lọc và rửa tinh thể qua phễu thủy tinh xốp bằng dung môi lạnh cùng loại. Kiểm tra độ tinh khiết trên SKLM.

Kiểm tra độ tinh khiết:

Khai triển SKLM với 3 hệ dung môi khác nhau, phân tích sắc ký đồ dưới UV 254nm, 365nm, TT Vanilin-Sufuric (VS) và TT Dragendorff.

Xác định cấu trúc

Bằng kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối MS.

2.2.4 Khảo sát tác dụng kháng khuẩn

Chuẩn bị mẫu

Cân 100 mg mẫu thử hòa tan với 100 µl DMSO. Sau đó thêm vào 900 µl nước cất.

Chuẩn bị mẫu vi sinh vật

Vi khuẩn: cấy hoạt hóa trên đĩa thạch TSA (Tryptic soy agar), ủ ở 37 °C trong 24 giờ, sau đó lấy 3-5 khóm khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào môi trường TSB (Tryptic soy Broth). Ủ từ 2-6 giờ ở 37 °C để vi khuẩn tăng sinh. Chính độ đục vi khuẩn bằng nước muối sinh lý 0,9%, huyền dịch vi khuẩn được điều chỉnh về giá trị OD (optical density) 0,08-0,12 tại bước sóng 625 nm. Giá trị này ứng với khoảng 1-2x10⁸ CFU/ml.

Tiến hành

Môi trường sau khi pha được tiệt trùng ở 121 °C trong 2 giờ và được đổ đều vào đĩa petri vô trùng, để cho thạch đông tự nhiên.

Huyền dịch vi khuẩn được trải đều trên mặt thạch bằng que bông vô trùng.

Đục lỗ đường kính 6 mm trong bản thạch. Cho vào mỗi lọ 50 µl dung dịch thử. Để yên khoảng 15 phút cho các chất thử

nghiệm khuếch tán vào lớp môi trường. Đồng thời chuẩn bị mẫu chứng âm là DMSO 10%.

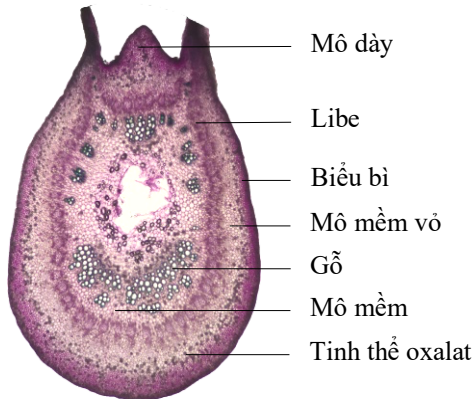
Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm ở 35-37 °C.

Đọc kết quả sau 16-18 giờ đối với vi khuẩn. Chất thử có tác động kháng khuẩn sẽ cho vòng ức chế xung quanh lỗ. Đo và ghi nhận đường kính vòng ức chế bằng kẹp có độ chia nhỏ nhất bằng 0,01 nm.

Phân loại mức độ kháng khuẩn dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn (d): (+3) ức chế mạnh (d ≥ 15 mm); (+2) ức chế vừa (d = 10–14 mm); (+1) ức chế yếu (d < 9), (-) không ức chế.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

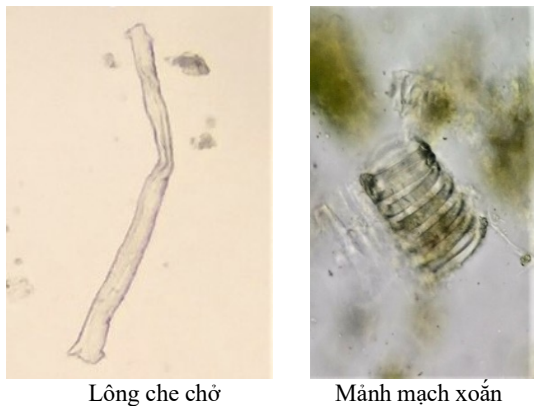
3.1 Nghiên cứu vi phẫu



Hình 3. Vi phẫu lá đu đủ

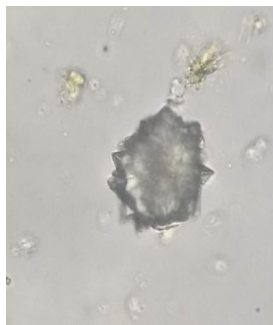
3.2 Nghiên cứu đặc điểm bột dược liệu

Soi dưới kính hiển vi, bột lá đu đủ gồm lông che chở, tinh thể calci oxalat hình cầu gai, mảnh tế bào chứa tinh thể calci oxalat, mảnh mạch xoắn,...

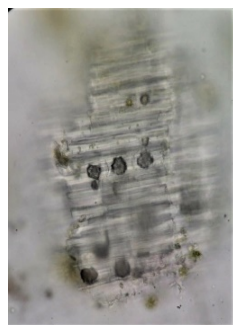


Lông che chở

Mảnh mạch xoắn



Tinh thể calci oxalat hình cầu gai



Mảnh tế bào chứa tinh thể calci oxalat

Hình 4. Cấu trúc có trong bột lá đu đủ

3.3 Xác định độ ẩm và độ tro

Bảng 1. Độ ẩm và độ tro

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB
Độ ẩm H%	4,0	3,8	3,9	3,9
Độ tro toàn phần	17,50	16,83	16,90	17,07

3.4 Phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật trong lá đu đủ

Bảng 2. Thành phần hóa học trong lá đu đủ

Nhóm chất	Thuốc thử phản ứng	Dịch ether	Dịch cồn	Dịch nước
Tinh dầu	Bay hơi tới cần có mùi thơm	-		
Chất béo	Làm mờ giấy lọc	-		
Triterpenoid	Lieberman – Burchard	+		
Alcaloid	Mayer (Valse-Mayer)	++	++	-
	Bouchardat	++	++	-
	Dragendoff	++	++	-
Coumarin	Tăng phát quang trong kiềm	-	-	
Atharaquinon	KOH 10%	-		
Flavonoid	Mg / HCl _{dd}	-	++	++
Glycosid tim	Thuốc thử vòng lacton		-	
	Thuốc thử đường 2-deoxy		-	
Tannin	Dung dịch FeCl ₃		+	+
	Dung dịch gelatin muối		-	-
Saponin	Lắc mạnh trong nước		+	-
Các chất khử	Thuốc thử Fehling		+	+
Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃		-	-
Polyuronid	Kết tủa trong cồn 96%			-

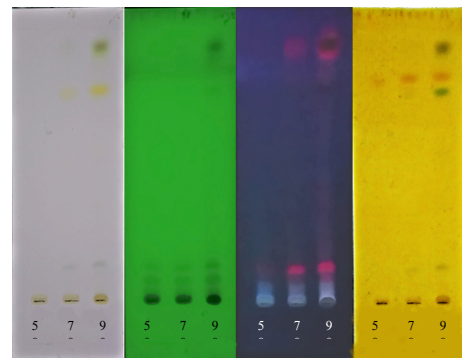
*Chú thích: (+) dương tính, (-) âm tính, ■ không tiến hành

3.5 Kết quả khảo sát điều kiện chiết

Bảng 3. Khảo sát hiệu suất chiết của các nồng độ cồn

Nồng độ EtOH (%)	Cồn 50%	Cồn 70%	Cồn 90%
Hiệu suất (%)	26,65	22,94	16,32

Kiểm tra bằng SKLM hệ dung môi cloroform - methanol (9:1, 2 giọt NH₃đđ):



Hình 5. Kết quả SKLM cao cồn 50, 70, 90

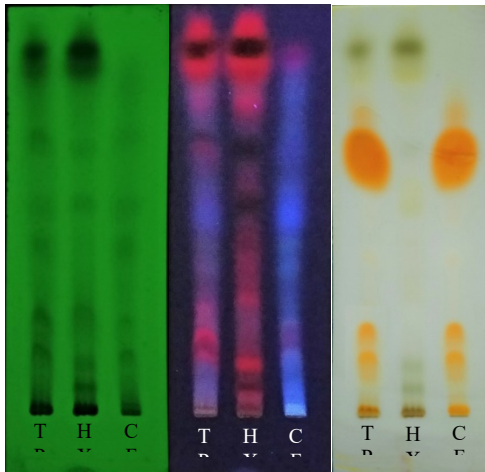
Kết luận: Lựa chọn cồn 70% làm dung môi chiết ngâm kiệt ở quy mô lớn.

3.6 Kết quả chiết cao toàn phần và cao alcaloid

Từ 8 kg bột lá đu đủ, sau khi chiết ngâm kiệt và cô thành cao đặc thu được khoảng 2440 g cao đặc. Tiến hành lắc phân bố theo sơ đồ **Hình 3** thu được 2 phân đoạn gồm 41 g cao n-hexan (HX) và 35 g cao cloroform (CF). Kiểm tra bằng SKLM hệ dung môi cloroform - methanol (9:1, 2 giọt NH₃dd).

Bảng 4. Khối lượng các cao phân đoạn

Dược liệu		Cao cồn đặc	Cao n-hexan	Cao cloroform
Khối lượng (g)	8000	2440	41	35
Hiệu suất (%)		30,5	0,51	0,44



Hình 6. SKLM cao toàn phần, n-hexan, cloroform

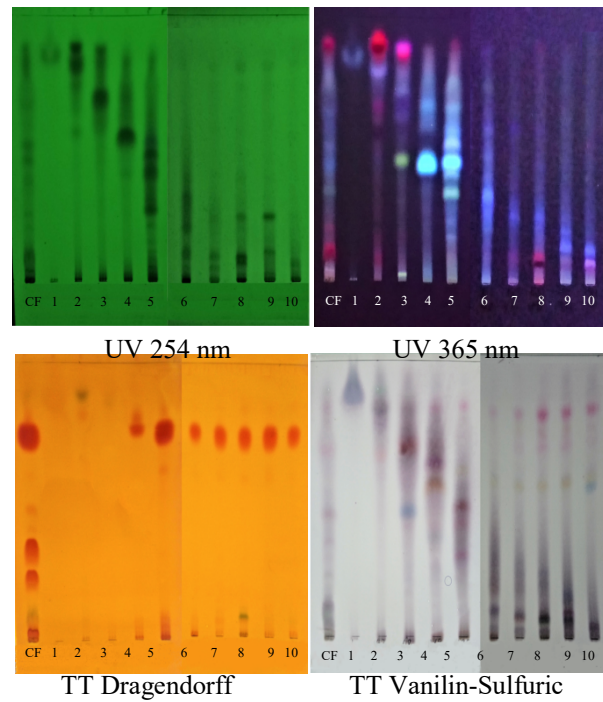
Kết luận: Chọn phân đoạn CF để tiến hành phân lập.

Tách các alcaloid từ cao alcaloid toàn phần bằng sắc ký cột chân không

Bảng 5. Các phân đoạn sau chạy cột

Phân đoạn	Dung môi khai triển	Số lọ	Cảm quan
CF 1	n-hexan-CHCl ₃ (1:0-8:2)	1- 42	Vàng nhạt
CF 2	n-hexan-CHCl ₃ (8:2)	43-67	Xanh đen
CF 3	n-hexan-CHCl ₃ (7:3-6:4)	68-217	Xanh hơi nâu
CF 4	n-hexan-CHCl ₃ (6:4-5:5)	218-294	Nâu
CF 5	n-hexan-CHCl ₃ (4:6-0:1)	295-1240	Nâu
CF 6	CHCl ₃ -EtAc (9:1-6-4)	1241-1560	Nâu
CF 7	CHCl ₃ -EtAc (5:5)	1561-1625	Nâu hơi xanh
CF 8	CHCl ₃ -EtAc (5:5)	1626-1715	Xanh đen
CF 9	CHCl ₃ -EtAc (5:5-4:6)	1716-1830	Xanh đen
CF 10	CHCl ₃ -EtAc (3:7-0:1)	1831-2120	Xanh đen

Kiểm tra SKLM tất cả các phân đoạn với hệ dung môi Cloroform - methanol (9:1, 2 giọt NH₃ dd):

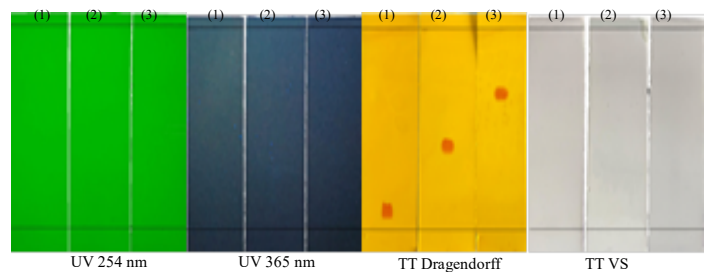


Hình 7. Kết quả SKLM các cao phân đoạn

Nhận xét: Từ SKLM cho thấy từ phân đoạn CF 4-10 đều có 1 vết alcaloid màu đỏ cam đậm với TT Dragendorff ở R_f khoảng 0,72-0,8 (**Hình 7**). Riêng phân đoạn CF5 vết màu đỏ cam rất đậm và xuất hiện tinh thể trắng lẫn tạp xanh ở đáy lọ. Do đó, lấy phân đoạn CF5 tiếp tục nghiên cứu.

3.7 Kết quả tinh chế

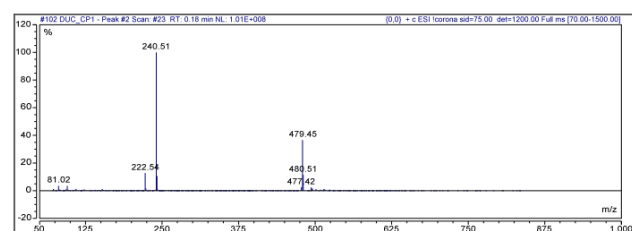
Phân đoạn CF5 được tinh chế bằng cách thay đổi độ tan trong các dung môi cloroform và n-hexan. Thu được 200 mg tinh thể hình khối không màu (CPI).



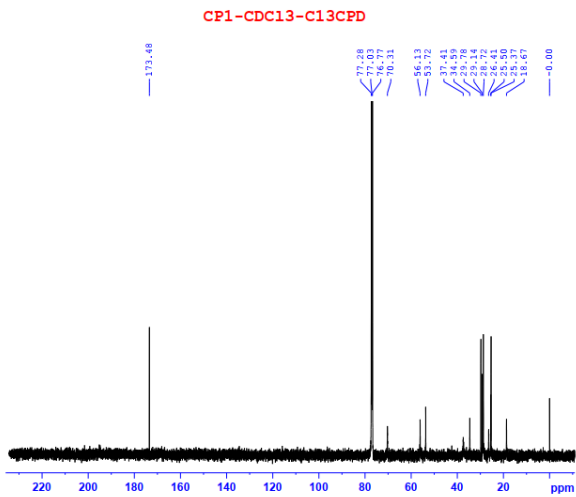
Hình 8. Kết quả SKLM chất CPI

Kiểm tra bằng SKLM bằng 3 hệ dung môi: (1) CHCl₃ (5 giọt NH₃dd); (2) CHCl₃-MeOH (9:1, 2 giọt NH₃dd); (3) EtAc-MeOH (9:1, 2 giọt NH₃dd). Soi bản mỏng theo thứ tự UV 254 nm ko có vết tắt quang, UV 365 nm không có vết phát quang, 1 vết duy nhất bằng TT Dragendorff, TT VS không có vết.

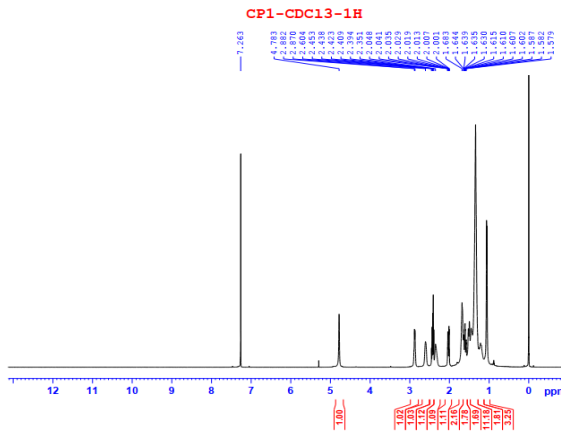
3.8 Xác định cấu trúc



ESI-MS: m/z 479 [M+H]⁺, 240 [M/2+H]⁺



¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ(ppm) 173,48 (s); 70,31 (s); 56,13 (s); 53,72 (s); 37,41 (s); 34,59 (s); 29,78 (s); 29,14 (s); 28,72 (s); 26,41 (s); 25,50 (s); 25,37 (s); 18,67 (s).



¹H-NMR (500MHz, CDCl₃): δ(ppm) 4,78 (s,1H); 2,88 (q, J₅ = 6,6 Hz, 1H); 2,60 (s, 1H); 2,48-2,38 (m, 1H); 2,38-2,24 (m, 1H); 2,15-1,95 (dq, J = 3,4 Hz, 1H); 1,76-1,13(m, 20H); 1,13-0,98 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

So sánh với tài liệu tham khảo, kết luận hợp chất CP1 là carpain. [5]

3.9 Kết quả thử kháng khuẩn

Bảng 6. Kết quả mức độ kháng khuẩn của các cao phân đoạn và chất CP1

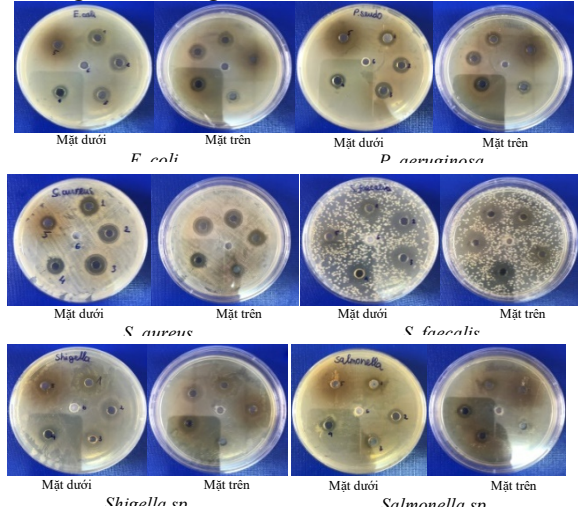
	Cao CF	CF5	CF6	CF7	CP1
<i>E.coli</i>	+2	+2	+2	+1	+2
<i>P.aeruginosa</i>	+2	+2	+2	+1	+2
<i>S.aureus</i>	+2	+2	+2	+1	+2
<i>S.faecalis</i>	+2	+2	+2	+2	+2

<i>Shigella sp</i>	+2	+2	+2	+2	+2
<i>Salmonella sp</i>	+2	+2	+2	+1	+2

**Chú thích:* +1: yếu; +2: trung bình; +3: mạnh

Cao CF cho tác dụng kháng khuẩn, tiếp tục thử tác dụng kháng khuẩn trên các phân đoạn CF5-CF7 và chất tinh khiết CP1 phân lập được.

Các cao phân đoạn và hợp chất phân lập được đều cho hoạt tính kháng khuẩn trung bình.



Hình 9. Kết quả thử tính kháng khuẩn

4. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu phân lập alkaloid carpain từ lá đu đủ, khảo sát các điều kiện chiết tách, kết luận ethanol 70% là điều kiện chiết carpain tối ưu. Sử dụng phương pháp sắc ký cột chân không và dung môi thích hợp để phân lập và tinh chế carpain. Ngoài ra, carpain còn cho hoạt tính kháng khuẩn trên các dòng vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Aniszewski, T. Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance. *Applications and Ecological Role. Elsevier.* **2007**, 4(2), 135-140.
- [2] Dermarderosian, A.; Beuler, J. The Review of Natural Products: The Most Complete Source of Natural Product Information. *Facts and Comparisons.* **2002**, 7(3), 486-487.
- [3] Fattorusso, E.; Orazio, T. Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology. *John Wiley & Sons.* **2008**, 15(3), 55-57.
- [4] Sankarganesh, P.; Baby Joseph, A. Phytomedicinal Chemistry and Pharmacognostic Value of *Carica papaya* L., Leaf. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* **2018**, 12(1), 751-756.
- [5] Wang, X. Isolation and Identification Carpaine in *Carica papaya* L. Leaf by HPLC-UV Method. *International Journal of Food Properties.* **2015**, 18(7), 1505-1512.