



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.130

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN ÁNH SÁNG VÀ THỜI GIAN SINH TRƯỞNG LÊN HÀM LƯỢNG MỘT SỐ HỢP CHẤT TRONG CÂY MÃ ĐÈ (*Plantago major*)

Nguyễn Văn Ấy^{1*}, Nguyễn Thị Quới Trâm², Đỗ Tấn Khang³ và Trần Thanh Mến²

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Ấy (email: nvay@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The environmental inbiotic factors and the plant growth phases can considerably change the contents of phytochemicals in higher plants. The present study was performed to evaluate the effects of light intensity and plant growth stages on the contents of some bioactive compounds in plantain (*Plantago major* L.). As results, the “specific agent reaction” helped find 8 types of bioactive substances (flavonoid, alkaloid, phenolic, tannin, coumarin, terpenoid, saponin and glycoside) in the plantain. Spectrometric method showed that the growth stages and light intensity considerably effected on the total contents of phenolic, tannin, and flavonoids compounds in this plant. For growth stages, the total contents of phenol, tannin and flavonoid in the 4-month-old plantain (6.58, 9.03 and 5.98 mg/g FW, respectively) are higher than those in 6-month-old one (2.88, 2.79 and 4.98 mg/g FW, respectively). For light condition, the plantains grew at 75% light intensity possess the highest total contents of these compounds (7.92, 4.25 and 6.74 mg/g FW, respectively), which are significantly different from those at other light conditions. In addition, the result showed the significant interaction between light intensity and plant growth stages on these found bioactive substances in the plantain.

TÓM TẮT

Các yếu tố môi trường sống và thời gian sinh trưởng có tác động rất lớn lên quá trình hình thành các hợp chất trong cây. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng một số hợp chất trong cây mã đề (*Plantago major* L.) đã được thực hiện. Kết quả cho thấy: (i) Có sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, alkaloid, phenolic, tanin, coumarin, terpenoid, saponin và glycoside trong cây mã đề khi định tính bằng các phản ứng màu đặc trưng; (ii) Thời gian sinh trưởng và cường độ ánh sáng có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng các hợp chất trong cây mã đề. Trong đó, cây 4 tháng tuổi có hàm lượng phenolic, tanin và flavonoid tổng (lần lượt là 6,58, 9,03 và 5,98 mg/g TLK) cao hơn ở cây 6 tháng tuổi (lần lượt là 2,88, 2,79 và 4,98 mg/g TLK). Cây mã đề trồng ở điều kiện ánh sáng 75% có hàm lượng các hợp chất phenolic, tanin và flavonoid tổng (lần lượt là 7,92, 4,25 và 6,74 mg/g TLK) cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy có sự tương tác giữa điều kiện ánh sáng và thời gian trồng lên hàm lượng các hoạt chất này.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/08/2019

Ngày nhận bài sửa: 16/08/2019

Ngày duyệt đăng: 30/10/2019

Title:

Effects of light intensity and growth stage on composition of some bioactive substances in *Plantago major* L.

Từ khóa:

Cây mã đề (*Plantago major* L.), cường độ ánh sáng, giai đoạn sinh trưởng, hoạt chất sinh học, phương pháp quang phổ

Keywords:

Bioactive substances, growth stages, light intensity, *Plantago major*, spectrometric method

Trích dẫn: Nguyễn Văn Ấy, Nguyễn Thị Quới Trâm, Đỗ Tấn Khang và Trần Thanh Mến, 2019. Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng một số hợp chất trong cây mã đề (*Plantago major*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5A): 66-73.

1 GIỚI THIỆU

Cây mã đề (*Plantago major* L.) là loại cây mọc tự nhiên nhưng được trồng phổ biến ở nhiều nơi của nước ta và trên thế giới. Đây là một cây dược liệu có nhiều tác dụng dược lý như: lợi tiểu, chữa ho, kháng sinh, chữa lý cấp và mãn tính, làm hưng phấn thần kinh, làm lành vết thương, chống viêm, giảm đau, chống oxy hoá, chống loét... Ngoài ra, mã đề lại ít độc với cơ thể sinh vật. Cây mã đề có tác dụng chữa bệnh là do có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như dẫn xuất của caffeic acid, flavonoid, iridoid glycosid, alkaloid, terpenoid và các acid hữu cơ (Rice-Evans *et al.*, 1996; Bohm *et al.*, 1998).

Việc nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc thực vật dùng làm dược liệu hay phụ gia thực phẩm có giá trị đã phát triển từ cuối những năm 50 của thế kỷ XX (Rao *et al.*, 2002). Tuy nhiên, việc sử dụng các dược liệu chiết xuất từ thực vật vẫn còn trở ngại do hàm lượng của các hoạt chất này khá thấp trong thực vật (dưới 1% trọng lượng khô) và hàm lượng các chất phụ thuộc rất lớn vào sinh lý và giai đoạn phát triển của cây (Rao *et al.*, 2002). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng trong suốt chu kỳ sống, các yếu tố kiểu gene và môi trường sống có tác động rất lớn đến quá trình hình thành các chất bên trong thực vật cũng như sự thay đổi hàm lượng các chất này (Szakiel *et al.*, 2011; Jolita *et al.*, 2012). Hơn nữa, chức năng chính của các chất chuyển hóa thứ cấp thực vật được cho là do sự thích nghi của thực vật đối với môi trường của chúng (Kliebenstein, 2004). Ngoài ra các thực vật cùng loài sống trong các môi trường khác nhau có thể khác nhau đáng kể về hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp (Szakiel *et al.*, 2011). Việc đánh giá tích lũy hàm lượng sản phẩm thứ cấp trong cây thay đổi cho thấy thông tin chính xác hơn về ảnh hưởng của các yếu tố môi trường trên con đường trao đổi chất (Hornok, 1992). Trong phạm vi của nghiên cứu này, việc khảo sát ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian trồng lên hàm lượng một số hợp chất trong cây mã đề (*Plantago major* L.) được thực hiện nhằm đánh giá sự tác động của thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng lên hàm lượng một số hợp chất có trong cây bằng phương pháp quang phổ.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

2.1.1 Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm được thực hiện tại nhà lưới, phòng thí nghiệm Sinh hóa và Sinh lý Thực vật, Bộ môn Sinh Lý - Sinh Hóa, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, từ tháng 6/2018 đến tháng 6/2019.

2.1.2 Vật liệu thí nghiệm

Dùng thiết bị đo cường độ ánh sáng (Lux meter) để thiết lập các chế độ ánh sáng bằng lưới che. Các nghiệm thức thí nghiệm gồm: 50%, 75% và 100% ánh sáng tự nhiên.

Cây mã đề được trồng trong các chậu nhựa (φ15 cm) chứa hỗn hợp giá thể đất và mụn xơ dừa (tỷ lệ 2:1 v/v) và đặt trong nhà lưới với 3 điều kiện ánh sáng khác nhau (50%, 75% và 100%). Cây được tưới nước 2 lần/ngày. Khi cây lên được 1 tháng tưới thêm phân ure mỗi tuần 1 lần. Mẫu mã đề thí nghiệm được thu vào hai giai đoạn: 4 tháng (cây ra hoa) và 6 tháng (cây tạo hạt). Sau đó loại bỏ rễ, lá úa vàng... Rửa sạch và sấy mẫu ($\leq 45^{\circ}\text{C}$) đến khi trọng lượng không đổi rồi đem nghiền mẫu thành bột để tiến hành thí nghiệm.

2.1.3 Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Các trang thiết bị và dụng cụ thuộc phòng thí nghiệm Sinh hóa và Sinh lý Thực vật, Bộ môn Sinh Lý-Sinh Hóa như: máy đo quang phổ Perkin Elmer, máy cô quay chân không, máy đông khô mẫu-VirTis, - Heidolph,...

Hóa chất thí nghiệm gồm: quercetin, tanin, gallic acid, methanol, FeCl_3 , dầu olive, chì acetat, ethanol, rượu isoamylic, H_2SO_4 , chloroform, thuốc thử Follin- Ciocalteu, Na_2CO_3 , NaNO_2 ,...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Ly trích mẫu

Cho 100 g mẫu bột mã đề và 800 mL methanol 80% vào bình tam giác 1000 mL. Lắc đều rồi trữ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ. Mỗi ngày siêu âm mẫu 1 lần trong 30 phút. Dịch chiết sau lọc được cô cạn bằng máy cô quay chân không. Sau khi cô quay, cao chiết được trữ ở nhiệt độ $4 - 5^{\circ}\text{C}$ để phân tích.

2.2.2 Phương pháp định tính một số hợp chất chính có trong dịch trích mã đề

Xác định sự hiện diện của các nhóm hợp chất thực vật có trong dịch trích cây mã đề theo quy trình của Tambe and Bhambar (2014) có cải tiến. Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (mẫu có thời gian sinh trưởng 6 tháng tuổi ở các điều kiện ánh sáng: 50%, 75% và 100%) với 5 lần lặp lại/nghiệm thức.

Phenolic: cho 50 μL dịch trích cho vào ống nghiệm, thêm 500 μL nước cất và 2 - 3 giọt FeCl_3 5%. Nếu dung dịch xuất hiện kết tủa màu xanh đen, chứng tỏ dịch trích chứa hợp chất của phenolic.

Tannin: cho 3 mL dịch trích vào ống nghiệm, thêm vào 3-5 giọt chì acetat bão hòa. Nếu dung dịch có xuất hiện kết tủa màu vàng nhạt, chứng tỏ dịch trích chứa hợp chất tannin.

Flavonoid: cho 1 mL dịch chiết cho vào ống nghiệm, thêm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc. Cho thêm 0,1 g bột Mg. Thêm từ từ rượu isoamyllic vào rồi đun nóng. Nếu dung dịch xuất hiện màu hồng sau đó chuyển sang đỏ cam hoặc đỏ tím chứng tỏ dịch trích có sự hiện diện của hợp chất flavonoid.

Alkaloid: cho 2 mL dịch trích phản ứng với 3 mL thuốc thử Bouchardat (2,5g iod, 5g KI, và 100 mL nước cất) để gây kết tủa hoàn toàn acid của alkaloid. Nếu trong dịch chiết chứa hợp chất của alkaloid thì dung dịch sẽ xuất hiện kết tủa màu nâu và tủa này sẽ tan khi cho một lượng dư thuốc thử Bouchardat.

Coumarin: cho 50 μ L dịch trích phản ứng với 750 μ L NaOH 10%. Nếu trong dịch chiết có chứa hợp chất của coumarin thì dung dịch sẽ xuất hiện màu vàng.

Terpenoid: cho 5 mL dịch trích vào ống nghiệm rồi hòa tan với 2 mL chloroform. Sau đó thêm từ từ 3 mL dung dịch H_2SO_4 đậm đặc. Nếu dung dịch xuất hiện màu nâu đỏ hoặc màu xanh lá chứng tỏ dịch trích có sự hiện diện của hợp chất của terpenoid.

Saponin: cho 50 μ L dịch chiết vào ống nghiệm; thêm 2 mL nước cất và vài giọt dầu oliu; đun nóng ống nghiệm ở 90°C. Nếu trong dịch trích có chứa hợp chất của saponin thì dung dịch xuất hiện nhũ tương màu sữa.

Glycoside: cho vào ống nghiệm 2 mL dịch chiết rồi thêm vài giọt dung dịch $FeCl_3$ 5% trong acetic acid vào và lắc đều; tiếp tục cho từ từ 0,5 mL dung dịch H_2SO_4 đậm đặc (tránh xáo trộn dung dịch trong ống nghiệm); ở mặt tiếp xúc giữa 2 lớp chất lỏng sẽ xuất hiện 1 lớp mỏng màu tím đỏ, lắc nhẹ, lớp chất lỏng phía trên có màu xanh lá chứng tỏ dịch chiết có chứa hợp chất của glycoside.

2.2.3 Phương pháp định lượng một số hợp chất chính trong dịch trích mã đề

Định lượng các hợp chất trong dịch trích mã đề cũng được thực hiện theo phương pháp của Tambe and Bhambar (2014) có cải tiến. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức (NT) với 5 lần lặp lại/nghiệm thức như sau:

- NT 1: Mẫu có thời gian sinh trưởng 4 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 50%
- NT 2: Mẫu có thời gian sinh trưởng 4 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 75%
- NT 3: Mẫu có thời gian sinh trưởng 4 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 100%
- NT 4: Mẫu có thời gian sinh trưởng 6 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 50%

- NT 5: Mẫu có thời gian sinh trưởng 6 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 75%

- NT 6: Mẫu có thời gian sinh trưởng 6 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 100%

a. Hàm lượng phenol tổng (mg/g trọng lượng khô, TLK)

Nồng độ phenolic tổng trong mẫu mã đề được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu như sau: Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1 mL dịch trích và 9 mL nước cất cho vào bình định mức 25 mL; thêm 1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu vào hỗn hợp và lắc đều; sau 5 phút, thêm 10 mL dung dịch Na_2CO_3 35%; sau đó thêm nước cất để dung dịch vừa đủ 25 mL; ủ mẫu trong 90 phút ở nhiệt độ phòng. Thực hiện phản ứng của các dung dịch chuẩn của gallic acid (nồng độ 20, 40, 40, 60, 80 và 100 μ g/mL) tương tự như mẫu dịch trích. Sau khi ủ, tiến hành đo hấp thụ đối với dung dịch dịch trích và dung dịch chất chuẩn ở bước sóng 550 nm.

b. Hàm lượng tannin tổng (mg/g TLK)

Tương tự như phân tích hàm lượng phenolic tổng, hàm lượng tannin tổng cũng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu: Lấy 0,1 mL dịch trích vào bình định mức 10 mL, sau đó thêm 7,5 mL nước cất và 0,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu phenol; cho 1 mL dung dịch Na_2CO_3 35% và định mức đến 10 mL bằng nước cất. Hỗn hợp được lắc đều và giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các dung dịch chuẩn của gallic acid (20, 40, 40, 60, 80 and 100 μ g/mL) được tiến hành tương tự như mẫu dịch chiết trên. Sau 30 phút, tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch mẫu và chất chuẩn ở bước sóng 725 nm.

c. Hàm lượng flavonoid tổng (mg/g TLK)

Tổng lượng flavonoid được xác định thông qua sự tạo phức chất với aluminium chloride như sau: cho 1 mL dịch chiết và 4 mL nước cất vào bình định mức 10 mL; thêm 0,3 mL sodium nitrite 5% và để trong 5 phút; sau đó thêm 0,3 mL aluminium chloride 10%; sau 5 phút, cho thêm 2 mL dung dịch NaOH 1M và định mức đến 10 mL bằng nước cất. Các dung dịch chuẩn của quercetin (20, 40, 40, 60, 80 and 100 μ g/mL) được chuẩn bị tương tự như mẫu dịch trích trên. Độ hấp thụ đối với các dung dịch mẫu và dung dịch chuẩn được đo ở bước sóng 510 nm.

2.3 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê bằng chương trình SPSS 21.0. Phân tích phương sai (ANOVA) để diễn tả sự khác biệt giữa các nghiệm thức, so sánh trung bình bằng kiểm định Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Những yếu tố bên trong và bên ngoài tác động đến hàm lượng và sự hình thành các chất trong cây. Điều này gây khó khăn cho việc xác định những yếu tố làm thay đổi hàm lượng các chất chứa trong cây. Việc kích thích sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp trong cây dược liệu bằng cách kiểm soát và tối ưu hóa các yếu tố bên ngoài và bên trong có thể được áp dụng để phát triển công nghệ sinh học sản xuất thuốc chất lượng cao (Poutaraud and Girardin, 2005). Các kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy: cường độ ánh sáng và nhiệt độ là nhân tố có liên quan đến sự hình thành và sự chuyển hóa hợp chất biến dưỡng thứ cấp trong cây (Kaplan *et al.*, 2004; Zobayed *et al.*, 2006; Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Dựa trên cơ sở đó, các yếu tố ánh sáng, nhiệt độ, giai đoạn sinh trưởng của thực vật – độ tuổi của cây đã được khảo sát nhằm đánh

giá ảnh hưởng của các yếu tố này tác động lên sự hiện diện và tích lũy một số các hợp chất phenol, flavonoid và tannic acid,... trong cây mã đề *P. major*.

3.1 Định tính một số hợp chất chính trong dịch trích mã đề

Bằng phương pháp sử dụng các chất chỉ thị và dựa vào sự biểu hiện (màu sắc, kết tủa, sự tách lớp) để nhận biết các hợp chất thực vật chính có trong mã đề. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy có 8 nhóm hợp chất hiện diện trong cây mã đề ở giai đoạn 6 tháng tuổi khi ở 3 điều kiện ánh sáng khác nhau (50%, 75% và 100%). Kết quả định tính các hợp chất này cũng tương tự như trong mô tả của Tambe and Bhambar (2014) trên cây *Hibiscus tiliaceus* L. Trên cơ sở này, tiếp tục tiến hành phân tích hàm lượng của chúng bằng phương pháp quang phổ ở bước tiếp theo.

Bảng 1: Kết quả định tính các nhóm hợp chất có trong dịch trích mã đề

Hợp chất	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết quả
Phenolic	FeCl ₃ 5%	Kết tủa màu xanh đen	+
Tannin	Pb(CH ₃ COO) ₂ bão hòa	Kết tủa màu vàng	+
Flavonoid	Ethanol 95% + 0,1g Mg + Rượu isoamylic	Dung dịch ban đầu có màu hồng rồi từ từ chuyển sang đỏ tím	+
Alkaloid	Thuốc thử Bouchardat	Kết tủa màu nâu	+
Coumarine	NaOH 10%	Dung dịch xuất hiện màu vàng	+
Terpenoid	Chloroform + H ₂ SO ₄ đậm đặc	Dung dịch xuất hiện màu nâu đỏ	+
Saponin	Dầu olive + nước cất	Dung dịch xuất hiện nhũ tương trắng sữa	+
Glycoside	Acetic acid + Clorua sắt 5% + H ₂ SO ₄ đậm đặc	Lớp chất lỏng phía trên cùng có màu xanh lá	+

(+) kết quả dương tính; (-) kết quả âm tính

3.2 Định lượng một số hợp chất chính trong dịch trích mã đề

3.2.1 Hàm lượng phenolic tổng số

Phương trình đường chuẩn của gallic acid được xây dựng dựa vào các nồng độ gallic acid (20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL), đo độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm. Kết quả cho thấy phương trình hồi quy tương quan của gallic acid là $Y = 0,0025X - 0,0265$ (với Y là độ hấp thụ quang phổ, X là nồng độ gallic acid và $R^2 = 0,9994$). Kết quả này cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa độ hấp thụ quang phổ với nồng độ gallic acid. Dựa vào phương trình hồi quy vừa thiết lập, tiến hành xác định hàm lượng phenolic trong mẫu dịch chiết của mã đề.

Kết quả về ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng (ĐKAS) và thời gian sinh trưởng (TGST) lên hàm

lượng phenolic tổng trong dịch trích mã đề được thể hiện trong Bảng 2. Kết quả cho thấy ở các giai đoạn sinh trưởng và điều kiện ánh sáng có tác động lên sự hình thành hàm lượng phenolic trong cây mã đề. Trong đó, ở giai đoạn 4 tháng tuổi (cây ra hoa) chứa 6,58 mg/g TLK, cao hơn so với sự hình thành hàm lượng phenolic so với ở giai đoạn 6 tháng tuổi (cây tạo hạt), chứa 2,88 mg/g TLK, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Mặt khác, kết quả thống kê ở Bảng 1 cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% về ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng lên sự hình thành hàm lượng phenolic tổng trong cây mã đề; trong đó cao nhất là ở ĐKAS 75% (7,92 mg/g TLK) khác biệt so với ở ĐKAS 50% và 100% (lần lượt là 3,04 mg/g và 3,24 mg/g TLK).

Bảng 2: Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng phenolic tổng (mg/g TLK)

Thời gian sinh trưởng (tháng, sau khi trồng)	Điều kiện ánh sáng (%)			Trung bình (TGST, B)
	50	75	100	
4	3,12 bc	12,68 a	3,95 b	6,58 a
6	2,96 bc	3,16 bc	2,52 c	2,88 b
Trung bình (ĐKAS, A)	3,04 c	7,92 a	3,24 b	
P _(A)		**		
P _(B)		**		
P _(AxB)		**		
CV (%)		3,14		

Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Kết quả thống kê ở Bảng 2 cũng cho thấy có sự tương tác có ý nghĩa thống kê ở mức 1% giữa thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng lên quá trình hình thành hàm lượng phenolic trong cây. Trong đó, nghiệm thức cây trồng ở giai đoạn 4 tháng tuổi trồng ở điều kiện 75% ánh sáng (12,68 mg/g TLK) tích lũy hàm lượng phenolic cao nhất so với các nghiệm thức còn lại, trong đó thấp nhất là nghiệm thức cây ở giai đoạn 6 tháng tuổi trồng ở điều kiện 100% ánh sáng (2,52 mg/g TLK). Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Pieroni *et al.* (2011) trên cây *Miconia albicans*.

3.2.2 Hàm lượng tannin tổng

Tương tự như định lượng phenolic tổng, để định lượng hàm lượng tanin tổng, phương trình đường chuẩn của gallic acid được xây dựng ở các nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL, nhưng được tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 725 nm. Kết quả cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa độ hấp thụ

quang với nồng độ của hợp chất gallic acid với phương trình hồi quy tương quan $Y = 0,0011X + 0,0017$ ($R^2 = 0,9918$), với Y là độ hấp thụ quang phổ, X là nồng độ gallic acid). Dựa vào phương trình hồi quy này, kết quả về ảnh hưởng của điều kiện thời gian và điều kiện ánh sáng lên hàm lượng tannin có trong cây mã đề được thể hiện trong Bảng 3.

Dựa vào kết quả ở Bảng 3 cho thấy hàm lượng tannin tích lũy vào giai đoạn cây 4 tháng tuổi và 9,03 mg/g, cao hơn so với trong cây giai đoạn 6 tháng tuổi (2,79 mg/g TLK), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Tương tự, kết quả thống kê ở Bảng 3 cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% về sự ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng lên sự hình thành hàm lượng tannin trong cây mã đề. Cụ thể, cây mã đề ở điều kiện ánh sáng 75% có hàm lượng tannin cao nhất (19,24 mg/g TLK) và khác biệt so với các cây trồng ở điều kiện ánh sáng 50% (2,42 mg/g TLK) và 100% (4,07 mg/g TLK).

Bảng 3: Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng tannin tổng (mg/g TLK)

Thời gian sinh trưởng (tháng, sau khi trồng)	Điều kiện ánh sáng (%)			Trung bình (TGST, B)
	50	75	100	
4	2,76 c	19,24 a	5,09 b	9,03 a
6	2,08 c	3,26 c	3,05 c	2,79 b
Trung bình (ĐKAS, A)	2,42 c	11,25 a	4,07 b	
P _(A)		**		
P _(B)		**		
P _(AxB)		**		
CV (%)		1,75		

Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Ngoài ra, kết quả thống kê ở Bảng 3 cũng cho thấy có sự tương tác có ý nghĩa thống kê ở mức 1% giữa thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng lên quá trình hình thành hàm lượng tannin trong cây. Trong đó, nghiệm thức cây trồng ở giai đoạn 4 tháng tuổi, trồng ở điều kiện 75% ánh sáng (19,24 mg/g TLK) tích lũy hàm lượng tannin cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại, trong đó cao thứ

hai là cây ở giai đoạn 4 tháng tuổi trong điều kiện 100% (5,09 mg/g TLK), tuy nhiên giữa các nghiệm thức còn lại thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.2.3 Hàm lượng flavonoid tổng

Phương trình đường chuẩn để định lượng flavonoid tổng trong cây mã đề được thiết lập dựa trên các nồng độ của quercetin (20, 40, 60, 80, 100

µg/mL), khi đo độ hấp thu quang ở bước sóng 510 nm. Kết quả phương trình hồi quy tương quan có dạng $Y = 0,0026X - 0,0197$ (với $R^2 = 0,9904$, Y là độ hấp thu quang phổ, X là nồng độ quercetin). Kết quả này cho thấy mối tương quan chặt chẽ giữa độ hấp thu quang phổ với nồng độ quercetin. Dựa vào

phương trình hồi quy vừa thiết lập, tiến hành xác định hàm lượng flavonoid trong mẫu cây mã đề. Kết quả về ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian trồng lên hàm lượng flavonoid tổng trong cây mã đề được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng lên hàm lượng flavonoid tổng (mg/g TLK)

Thời gian sinh trưởng (tháng, sau khi trồng)	Điều kiện ánh sáng (%)			Trung bình (TGST, B)
	50	75	100	
4	1,55 c	8,13 a	8,26 a	5,98 a
6	4,55 b	5,34 b	5,04 b	4,98 b
Trung bình (ĐKAS, A)	3,05 c	6,74 a	6,65 b	
$P_{(A)}$		**		
$P_{(B)}$		**		
$P_{(AxB)}$		**		
CV (%)		3,49		

Trong cùng một cột hoặc hàng, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Tương tự như kết quả phân tích về hàm lượng của phenol và tannin. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy rằng có sự tác động của từng yếu tố thời gian sinh trưởng của cây và điều kiện ánh sáng cũng như sự tương tác của chúng lên hàm lượng flavonoid tổng trong cây mã đề (*P. major*). Trong đó, qua các giai đoạn sinh trưởng của cây, hàm lượng flavonoid tổng của cây ở giai đoạn 4 tháng tuổi (cây ra hoa) là 5,98 mg/g TLK, cao hơn so với hàm lượng flavonoid tổng của cây ở giai đoạn 6 tháng (cây tạo hạt, 4,98 mg/g TLK), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Ngoài ra, cây trồng ở điều kiện ánh sáng 75% có hàm lượng flavonoid cao nhất (6,74 mg/g TLK) và thấp nhất ở mức 50% (3,05 mg/g TLK), thí nghiệm có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Kết quả thống kê ở Bảng 4 còn cho thấy nghiệm thức cây mã đề ở giai đoạn 4 tháng tuổi ở điều kiện ánh sáng 100% và 75% cho kết quả tích lũy hợp chất flavonoid tổng cao nhất (lần lượt là 8,26 mg/g TLK và 8,13 mg/g TLK), và nghiệm thức cho hàm lượng flavonoid tổng thấp nhất là nghiệm thức cây ở giai đoạn 4 tháng tuổi ở điều kiện 50% (1,55 mg/g TLK).

Hàm lượng của các hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật phụ thuộc rất lớn vào giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây (Rao and Ravishankar, 2002). Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng của các hợp chất phenolic, tannin và flavonoid được tích lũy khác nhau ở cả 2 giai đoạn sinh trưởng của cây mã đề *P. major* khi trồng ở 3 điều kiện ánh sáng khác nhau. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Ay *et al.* (2017) trên cây mã đề *P. depressa* Willd cho thấy hàm lượng aucubin tăng dần và khác nhau qua các giai đoạn sinh trưởng và nhiệt độ cao và cường độ ánh sáng có tác động tích cực đến sự tích lũy của aucubin; hay kết quả nghiên cứu của

Fuchs and Bowers (2004) đã chứng minh rằng hàm lượng iridoids tăng dần theo độ tuổi và thay đổi theo từng giai đoạn sinh trưởng trên cây mã đề *Plantago lanceolata* và hàm lượng iridoids cũng khác nhau ở các bộ phận của cây.

Trong thực vật, các hợp chất bảo vệ như glycosid và enzyme thủy phân thường tạo thành một hệ thống phòng thủ kép, trong đó glycoside được kích hoạt bởi các enzyme để phát huy tác dụng sinh học. Theo nghiên cứu của Buschmann and Muller (2013) nồng độ của iridoid glycoside cũng như hoạt động β -glucosidase khác nhau trong lá khi ở các độ tuổi khác nhau. Nồng độ của các hợp chất bảo vệ cũng như hoạt động β -glucosidase, cao nhất ở lá non và giảm lá già. Hơn nữa, các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ cao, ánh sáng cũng ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng tanin.

Ánh sáng là yếu tố kích thích để sản sinh các hợp chất biến dưỡng thứ cấp (Anasori and Asghari, 2008). Thêm vào đó, nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến quá trình sinh lý của thực vật như các sự biểu hiện của gene, hiện tượng quang hợp và sự cân bằng carbon tác động tích cực hoặc tiêu cực (Morison and Lawlor, 1999). Yếu tố quan trọng kiểm soát việc sản xuất các chất biến dưỡng là ánh sáng và nhiệt độ môi trường (Kaplan *et al.*, 2004; Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Mặt khác, stress do nhiệt độ sẽ làm giảm sinh khối thực vật, quang hợp và tăng nồng độ chuyển hóa của rễ thứ sinh trên cây nhân sâm *Panax quinquefolius* (Jochum *et al.*, 2007).

Theo Alonso-Amelot *et al.* (2007) khi so sánh các lá cây phơi nắng và tự che nắng ở cây *Pteridium arachnoideum*, với sự gia tăng cường độ cao thì sự tích lũy lượng phenol và tanin cao hơn bình thường.

Ngoài ra, stress nước vào mùa khô cũng gây ra sự gia tăng phenol và tanin, do đó có thể kết luận rằng bức xạ UV-B và lượng nước là những yếu tố quan trọng trong phản ứng thích nghi của cây, tuy nhiên không thích nghi với nồng độ stress cao. Phenol và tanin được tổng hợp trong thực vật không chỉ thông qua các yếu tố di truyền, nhu cầu sinh lý và nhu cầu phòng thủ, mà còn do ảnh hưởng của stress môi trường như hạn hán, bức xạ UV-B và ô nhiễm không khí (Claudia *et al.*, 2010). Ngoài ra, sớ dĩ có sự khác nhau về hàm lượng và thành phần hóa học của các chất biến dưỡng thứ cấp trong cùng loài hoặc cùng họ có thể là do sự khác biệt về điều kiện sinh trưởng, phát triển cũng như môi trường địa lý. Bên cạnh đó, các yếu tố sinh thái và môi trường sống bên ngoài cũng tác động lớn đến khả năng sinh tổng hợp các hợp chất hữu cơ.

Tóm lại, các chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật là các chất không có chức năng trực tiếp trong các quá trình đồng hóa, hô hấp, vận chuyển, tăng cường và phát triển thực vật. Chức năng chủ yếu của các hợp chất thứ cấp là bảo vệ thực vật chống lại các tác nhân gây bệnh và động vật ăn cỏ. Nhiều chất thứ cấp có hoạt tính sinh học mạnh còn được dùng làm chất diệt côn trùng, nấm, dược chất. Hợp chất thứ cấp được phân làm ba nhóm chính ở thực vật: các terpen, các hợp chất phenolic và các hợp chất chứa Nitrogen. Thông thường chúng có thể tạo ra sự bảo vệ chống lại các áp lực môi trường. Tuy nhiên, theo Rao and Ravishankar (2002), việc sản xuất các hợp chất này thường thấp và phụ thuộc nhiều vào sinh lý và các giai đoạn sinh trưởng của cây. Vì vậy, điều kiện ánh sáng, nhiệt độ và giai đoạn sinh trưởng là các yếu tố chính có ảnh hưởng lớn đến sự hình thành các hợp chất thứ cấp trong cây. Tuy nhiên, ở chiều ngược lại khi thực vật bị stress, sự trao đổi giữa cacbon với sự hình thành các hợp chất thứ cấp xảy ra sẽ có tính chất kháng lại các stress này (Bryant *et al.*, 1983). Theo nghiên cứu của Winkel-Shirley *et al.* (2001), các stress môi trường khác nhau như: tia cực tím, ánh sáng xanh, ánh sáng cường độ cao, vết thương hay sự tấn công của mầm bệnh, hạn hán, thiếu đường, chất dinh dưỡng lại kích thích được sự tích lũy hàm lượng anthocyanin.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Khảo sát định tính về thành phần hóa học của dịch trích mã đề bằng các thuốc thử đặc trưng cho thấy có sự hiện diện của các hợp chất phenolic, tannin, flavonoid, alkaloid, coumarine, terpenoid, saponin và glycoside trong cây mã đề ở giai đoạn 6 tháng tuổi.

Điều kiện ánh sáng và thời gian sinh trưởng đều có ảnh hưởng lên hàm lượng các hợp chất phenolic, tannin, flavonoid sinh ra ở giống mã đề. Trong đó:

Hàm lượng hợp chất phenolic tổng, tanin và flavonoid tổng (lần lượt là 6,58, 9,03 và 5,98 mg/g TLK) ở cây mã đề 4 tháng tuổi có hàm lượng cao hơn ở cây 6 tháng tuổi (lần lượt là 2,88, 2,79 và 4,98 mg/g TLK).

Cây mã đề trồng ở điều kiện ánh sáng 75% có hàm lượng các hợp chất phenolic tổng, tanin và flavonoid tổng (lần lượt là 7,92, 4,25 và 6,74 mg/g TLK) cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

4.2 Đề xuất

Khảo sát thêm sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường khác như nhiệt độ, độ ẩm, khí hậu, nguồn nước,... lên sự hình thành các hợp chất biến dưỡng thứ cấp trong giống mã đề *Plantago major* nhằm gia tăng hàm lượng các hợp chất thứ cấp để góp phần vào việc nghiên cứu và phát triển các dược phẩm mới từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alonso-Amelot, M.E., A. Oliveros-Batidas and M.P. Calcagno-Pisarelli, 2007. Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation, and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35: 1-10.
- Anasori, P. and G.Asghari, 2008. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Res Pharm Sci* 3(1): 59-63.
- Ay, N.V., M.V. Duy, D.T. Khang, T.N. Binh, A. Khajidusren, B. Oyungerel and E. Vanjidorj, 2017. Comparative analysis on aucubin content in different ecotypes of plantain plant (*Plantago* sp.). *An Giang University Journal of Science* – 2017, 5(2): 9 – 18.
- Blainski, A., G.C. Lopes and J.C.P.D. Mello, 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865.
- Bohm, H, H. Boeing, J. Hempel, B. Raab and A. Kroke, 1998. Flavonols, avones ad anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 37: 147-163.
- Bryant J.P., F.S.I. Chapin and D.R. Klein 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40: 357-68.
- Buschmann, H.P.T. and C. Müller, 2013. Role of plant β -glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing

- enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. *Phytochemistry*. Volume 94: 99–107.
- Claudia, M.F., B.M. Lucimar, Y.A.C. Deborah and S. Dos, 2010. Tannins: what do they represent in plant life? Nova Science Publishers. Inc. ISBN: 978-1-61761-127-8.
- Fuchs, A. and M.D. Bowers, 2004. Ecological content influences pollinator deterrence by alkaloids in floral nectar. *Ecology Letters*. 10: 375 - 382.
- Hornok, L., 1992. *Cultivation and processing of Medicinal Plants* – Chichester: John Wiley and Sons.
- Jochum, G.M., K.W. Mudge and R.B. Thomas, 2007. Elevated temperatures increase leaf senescence and root secondary metabolite concentration in the understory herb *Panax quinquefolius* (Araliaceae). *Am J Bo.* 94:819-26; PMID: 21636451.
- Jolita, R., K. Birute and S. Zydrūnas, 2012. Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in ST. John's worth. *Botanica Lithuanica*. 18(2): 101–108.
- Kaplan, F., J. Kopka, D.W. Haskell, W. Zhao, K.C. Schiller, N. Gatzke, D.Y. Sung and C.L. Guy, 2004. Exploring the temperature stress metabolome of arabidopsis, *Plant Physiology*. 136: 4159-4168.
- Kliebenstein, D.J., 2004. Secondary metabolites and plant environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell Environment*. 27: 675–684.
- Morison, J.I.L. and D.W. Lawlor, 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant Cell Environ*. 22: 659-82.
- Pieroni, L.G., F.M. Rezende, V.F. Ximenes and A.L. Dokkedal, 2011. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 16: 9439–9450.
- Poutaraud, A. and P. Girardin, 2005. Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genetic Resources*. 3(2): 178–189.
- Ramakrishna, A. and G.A. Ravishankar, 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1720-1731.
- Rao, S.R. and G.A. Ravishankar, 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol Adv*. 20: 101-53.
- Rice-Evans, C.A., J.M. Miller and G. Paganga, 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavon-oids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Szakiel, A., C. Paczkowski and M. Henry, 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev*. 10(4): 471-491.
- Tambe, V.D. and R.S. Bhambar, 2014. Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. *Wood extract Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4: 41-47.
- Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid biosynthesis, a color- ful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*. 26: 485-93.
- Zobayed, S.M.A., F. Afreen, E. Goto and T. Kozai, 2006 . Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany*. 98: 793–804.