

NGHIÊN CỨU VỀ FLAVONOID VÀ SÀNG LỌC TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA MỘT SỐ CÂY THUỐC THU HÁI Ở KHU VỰC ĐỒI NÚI HÀ NỘI

*Phạm Văn Vượng**; *Nguyễn Văn Long**; *Lê Bách Quang**
*Vũ Bình Dương**; *Lê Thị Thanh Thảo***

TÓM TẮT

Khảo sát thành phần hóa học một số cây thuốc có tác dụng chống oxy hóa ở khu vực Hà Nội. Lựa chọn cây thuốc có tác dụng chống oxy hóa để định tính và định lượng flavonoid, sàng lọc tác dụng chống oxy hóa. Kết quả cho thấy: tất cả các cây thuốc chống oxy hóa đều có phản ứng dương tính với thuốc thử flavonoid và có hàm lượng flavonoid cao. Dịch chiết của những cây thuốc này đều có tác dụng chống oxy hóa, thể hiện qua hoạt tính chống oxy hóa (HTCO%), trong đó cây Đò ngon có hoạt tính mạnh nhất.

* Từ khóa: Cây thuốc; Flavonoid; Chống oxy hóa.

DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND SCREENING ANTIOXIDANT EFFECT OF MEDICINAL PLANTS HARVESTED IN MOUNTAINOUS AREAS OF HANOI

SUMMARY

*The chemical composition of medicinal plants that have anti-oxidant activity in the Hanoi area were surveyed. Some medicinal plants were selected to conduct to determine flavonoid and anti-oxidant effects. Results showed that all plants contained high concentration of flavonoid. Extracts of these medicinal plants showed good anti-oxidative activity, especially leaves of *Cratoxylum prunifolium*.*

* *Key words: Medicinal plants; Flavonoid; Antioxidant.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, việc nghiên cứu sàng lọc hợp chất thiên nhiên có tác dụng điều trị bệnh, nhất là các bệnh hiểm nghèo, nan y đang là

hướng đi được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm. Qua nghiên cứu giúp bảo tồn những cây thuốc quý, những cây thuốc có nguy cơ tuyệt chủng.

* Học viện Quân y

** Cao Đẳng Y tế Hà Đông

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

Flavonoid là một hợp chất lớn, có nhiều hoạt tính sinh học quý. Đã có nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước

chứng minh tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, giảm đau, kháng khuẩn chống oxy

hóa, hỗ trợ điều trị ung thư của các hợp chất này [4].

Tại khu vực Hà Nội mở rộng (bao gồm cả tỉnh Hà Tây cũ) có rất nhiều loài cây thuốc mọc hoang dại hoặc được gây trồng có giá trị cao, trong đó nhóm cây có tác dụng chống oxy hóa cũng còn trữ lượng đáng kể. Qua nghiên cứu khảo sát về phân bố, trữ lượng của những cây thuốc; được sự hỗ trợ của chuyên gia đầu ngành về Dược liệu, đề tài đã chọn một số cây thuốc có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa để nghiên cứu về thành phần hoạt chất và tác dụng sinh học.

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả nghiên cứu *định tính, định lượng flavonoid và sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của một số cây thuốc thu hái ở khu vực đồi núi Hà Nội.*

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị.

** Nguyên liệu:*

Các mẫu cây thuốc có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa được thu hái ở 3 địa điểm khác nhau thuộc khu vực đồi núi Hà Nội: Ba Vì, Sóc Sơn, Mỹ Đức. Với cây thuốc chống oxy hóa, lựa chọn 10 cây thuốc (Đỏ ngọn, Chè, Bán chi liên, Chó đẻ răng cưa, Đơn kim, Hạ khô thảo, Nghê bông, Rau má, Thổ phục linh, Kim ngân) để nghiên cứu về flavonoid và sàng lọc tác dụng chống oxy hóa. Các mẫu thu hái trong khoảng thời gian tháng 6 đến 10 - 2009), rửa sạch, phơi, sấy khô và tán bột ở kích thước thích hợp.

** Hóa chất:*

Ethanol, ethyl acetat, n-hexan, FeCl_3 5%, pethroether, amoniac, methanol, 1,1-

diphenyl-2-picrylhydrazyl, acid thiobarbituric, acid tricloacetic... Tất cả các hóa chất dung môi đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

** Thiết bị:*

Cân phân tích Sartorius (độ chính xác 0,1 mg); máy lắc MS1 Minishaker (IKA® Mỹ); máy chiết siêu âm Soniclean 450HT (Úc), bộ dụng cụ chiết Soxhlet...

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Nghiên cứu về flavonoid:*

- Định tính: định tính flavonoid có trong các mẫu cây thuốc dựa vào phản ứng hóa học [2], cụ thể: dược liệu sau khi rửa sạch, thái nhỏ ở kích thước thích hợp, phơi sấy khô ở nhiệt độ không quá 70°C . Sau khi sấy khô, nghiền nhỏ dược liệu đến kích thước thích hợp. Cân một lượng bột dược liệu (khoảng 5g), chiết flavonoid bằng siêu âm có gia nhiệt, dùng dung môi cồn 70° (chiết 3 lần, mỗi lần 20 ml). Gộp các dịch chiết, cô cạn đến cạn dưới áp suất giảm. Cắn thu được phân tán vào 50 ml nước. Loại tạp bằng n-hexan (20 ml). Sau đó, chiết nhiều lần bằng ethyl acetat. Cắt thu hồi dịch chiết ethyl acetat được cắn. Hòa tan cắn trong cồn 96° (5 ml) được dung dịch A để tiến hành phản ứng hóa học.

+ Phản ứng 1: lấy 1ml dung dịch A cho vào ống nghiệm, thực hiện phản ứng với thuốc thử cyanidin.

+ Phản ứng 2: lấy 1ml dung dịch A cho vào ống nghiệm, cho vào ống nghiệm vài giọt dung dịch FeCl_3 5%.

+ Phản ứng 3: nhỏ vài giọt dung dịch A lên giấy lọc, để cho khô rồi hơi trên hơi amoniac.

- Định lượng:

Tiến hành định lượng flavonoid toàn phần có trong dược liệu bằng phương pháp cân: cân chính xác khoảng 50g bột dược liệu, xác định độ ẩm, cho vào túi giấy lọc,

rồi cho vào dụng cụ Soxhlet. Thêm pethroether và chiết trong 8 giờ để loại chất béo, chất màu. Sau đó, lấy túi lọc ra cho bay hơi hết pethroether, tiếp tục cho túi được liệu vào dụng cụ chiết Soxhlet và chiết flavonoid toàn phần bằng methanol đến khi dịch chiết cuối cùng hết phản ứng của flavonoid (không cho phản ứng với thuốc thử cyanidin). Cô dịch chiết methanol dưới áp suất giảm đến cạn. Hòa tan cạn trong 100 ml nước cất nóng, để nguội. Lắc nhiều lần với ethyl acetat cho đến kiệt flavonoid. Cát thu hồi dung môi được cạn, sấy cạn ở 80°C đến khối lượng không đổi, cân.

Hàm lượng flavonoid toàn phần trong dược liệu được tính theo công thức:

$$[\text{flavonoid}]_{\text{tp}} (\%) = \frac{m}{a \cdot (100\% - x\%)} \times 100$$

m: Khối lượng cần flavonoid thu được (g).

a: Khối lượng dược liệu đem định lượng (g).

x%: Độ ẩm của dược liệu.

* *Sàng lọc tác dụng chống oxy hóa trên in vitro:*

- Phương pháp xác định hoạt tính ức chế gốc tự do bằng thử nghiệm DPPH [5].

Các dịch chiết nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa theo cơ chế ức chế gốc tự do sẽ làm giảm màu của 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Xác định khả năng này bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại tại $\lambda = 517 \text{ nm}$.

Cho 1ml các mẫu thử (pha trong DMSO) phản ứng với dung dịch DPPH nồng độ 200 μM (pha trong ethanol) thu dung dịch cuối cùng có nồng độ mẫu thử là 100 $\mu\text{g/ml}$ và nồng độ DPPH là 190 μM . Hỗn hợp sau khi

pha để ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo mật độ quang ở bức sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$.

- Phương pháp xác định sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid (định lượng MDA) [6, 7]:

Nguyên tắc: xác định khả năng ức chế pero malonyl dialdehyd (MDA) là sản phẩm của quá trình peroxy hóa màng tế bào. MDA có khả năng phản ứng với axit thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở $\lambda = 532 \text{ nm}$. Cường độ màu của dung dịch tỷ lệ thuận với hàm lượng MDA.

Tiến hành: cho 0,1 ml mẫu thử phản ứng với 0,5 ml dịch đồng thể não và thêm đệm phosphate vừa đủ 2 ml. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 15 phút và dừng phản ứng với 1ml axit tricloacetic. Sau khi ly tâm, lấy dịch trong cho phản ứng với thiobarbituric 0,8% trong 15 phút ở nhiệt độ 100°C. Làm lạnh hỗn hợp và tiến hành đo mật độ quang ở bức sóng $\lambda = 532 \text{ nm}$.

- Tính toán kết quả:

Công thức tính % hoạt tính chống oxy hóa (HTCO):

$$\text{HTCO} \% = \frac{[(\text{OD}_c - \text{OD}_t) - (\text{OD}_c - \text{OD}_{\text{DMSO}})]}{\text{OD}_c} \times 100$$

OD_c: Mật độ quang của mẫu chứng.

OD_t: Mật độ quang của mẫu thử.

OD_{DMSO}: Mật độ quang của dung dịch DMSO.

* *Phương pháp xử lý số liệu:* xử lý số liệu theo phương pháp thống kê dùng trong y, sinh học, sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2003.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả nghiên cứu về flavonoid.

*** Định tính:**

Với 3 mẫu được thu hái ở ba khu vực khác nhau (Ba Vì, Mỹ Đức và Sóc Sơn) thuộc khu vực đồi núi Hà Nội, mỗi mẫu định tính 3 lần.

Bảng 1: Kết quả định tính flavonoid bằng phản ứng hóa học.

TÊN CÂY THUỐC	PHẢN ỨNG 1	PHẢN ỨNG 2	PHẢN ỨNG 3	KẾT QUẢ
Đỏ ngọn	+++	+++	+++	Có flavonoid
Bán chi liên	++	++	+++	Có flavonoid
Chè	++	++	+++	Có flavonoid
Chó đẻ răng cưa	+++	+++	+++	Có flavonoid
Hạ khô thảo	++	+++	++	Có flavonoid
Rau má	+++	+++	+++	Có flavonoid
Thỏ phục linh	+++	+++	++	Có flavonoid
Đơn kim	++	+++	++	Có flavonoid
Nghê bông	++	++	+++	Có flavonoid
Kim ngân	++	++	+++	Có flavonoid

Các mẫu cây thuốc đều cho phản ứng dương tính với thuốc thử dùng định tính flavonoid, chứng tỏ tất cả đều chứa flavonoid. Trong đó các mẫu: Đỏ ngọn, Rau má, Chó đẻ răng cưa cho phản ứng dương tính rất rõ.

*** Định lượng:**

Với 3 mẫu thu hái ở Ba Vì (mẫu 1), Mỹ Đức (mẫu 2), Sóc Sơn (mẫu 3), mỗi mẫu tiến hành định lượng flavonoid toàn phần 3 lần rồi lấy trung bình.

Bảng 2: Hàm lượng flavonoid toàn phần.

TÊN CÂY THUỐC	HÀM LƯỢNG FLAVONOID (%)		
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Đỏ ngọn	2,12 ± 0,24	2,09 ± 0,20	2,15 ± 0,19
Bán chi liên	1,41 ± 0,12	1,41 ± 0,14	1,48 ± 0,10
Chè	4,41 ± 0,15	4,28 ± 0,14	4,42 ± 0,12
Chó đẻ răng cưa	1,42 ± 0,12	1,43 ± 0,15	1,47 ± 0,15
Hạ khô thảo	1,06 ± 0,11	1,11 ± 0,12	1,09 ± 0,16
Rau má	4,50 ± 0,17	4,24 ± 0,24	4,24 ± 0,13
(1)	(2)	(3)	(4)
Thỏ phục linh	0,67 ± 0,07	0,74 ± 0,09	0,71 ± 0,10
Đơn kim	1,08 ± 0,16	1,07 ± 0,10	1,10 ± 0,12

Nghề bông	1,25 ± 0,13	1,22 ± 0,13	1,26 ± 0,13
Kim ngân	3,51 ± 0,42	3,38 ± 0,67	3,46 ± 0,24

2. Sàng lọc tác dụng chống oxy hóa.

Hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết Đở ngọn, Đơn kim, Kim ngân, Diệp hạ châu, Hạ khô thảo, Nghề bông, Bán chi liên, Thổ phục linh, Chè, Cối xay được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO%) của các dịch chiết thông qua định lượng DPPH và MDA.

MẪU NGHIÊN CỨU	DPPH	MDA
Dịch chiết Diệp hạ châu	40,18	50,34
Dịch chiết Đở ngọn	70,34	68,76
Dịch chiết Đơn kim	67,98	65,64
Dịch chiết Hạ khô thảo	40,27	71,25
Dịch chiết Nghề bông	38,63	56,24
Dịch chiết Rau má	29,54	29,35
Dịch chiết Bán chi liên	47,21	40,41
Dịch chiết Thổ phục linh	33,96	60,59
Dịch chiết Chè	60,23	52,81
Dịch chiết Cối xay	19,81	36,15

Tất cả dịch chiết của các cây thuốc đều thể hiện tác dụng chống oxy hóa trên cả hai thử nghiệm DPPH và MDA. Trong đó, dịch chiết Đở ngọn thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất, HCO% ở 2 thử nghiệm tương ứng là 70,34 % và 68,76%.

BÀN LUẬN

Khu vực đồi núi Hà Nội là khu vực có tiềm năng lớn về tài nguyên cây thuốc. Đây cũng là vùng có sự đa dạng sinh học với nhiều loài cây thuốc. Dưới sự giúp đỡ của các chuyên gia về Dược liệu, Dược học cổ truyền, Thực vật, đề tài hướng đến những cây thuốc có tác dụng chống oxy hóa. Kết quả nghiên cứu (*bảng 1*) cho thấy tất cả cây thuốc chống oxy hóa đều chứa flavonoid. Đã từ lâu, người ta đã biết đến tác dụng chống oxy hóa như Đở ngọn, Kim ngân, Chè... [1, 3]. Như vậy, có thể sơ bộ xác định: flavonoid là hợp chất đóng vai trò chính tạo nên tác dụng chống oxy. Nghiên cứu cũng góp phần làm sáng tỏ kinh nghiệm của nhân dân địa phương về sử dụng những cây thuốc để điều trị bệnh liên quan đến tác dụng chống oxy hóa.

Kết quả xác định hàm lượng flavonoid toàn phần của 10 cây thuốc phổ biến được bà con sử dụng nhiều với những tác dụng như điều trị mẩn ngứa, giải độc gan, điều trị rắn cắn, giải rượu (liên quan đến tác dụng chống oxy hóa)... cho thấy: những cây thuốc này đều chứa hàm lượng flavonoid khá cao. Trong đó, cây thuốc có hàm lượng cao là Chè, Rau má, Kim ngân với hàm lượng lần lượt là 4,42%, 4,50% và 3,51%. Tiếp theo là Đở ngọn (2,1%), các cây còn lại phần lớn đều có hàm lượng lớn hơn 1%. Với hàm lượng flavonoid như vậy, có thể sử dụng những cây thuốc này làm nguyên liệu để chiết xuất flavonoid.

Hàm lượng flavonoid của mỗi cây ở những khu vực khác nhau. 3 địa điểm mà đề tài nghiên cứu là khu đồi núi ở Sóc Sơn, Mỹ Đức và Ba Vì. Các địa điểm này cách xa nhau và giữa chúng có sự khác biệt về điều kiện khí hậu, địa chất. Kết quả (*bảng 2*) cho thấy, hàm lượng flavonoid giữa các khu vực có sự khác nhau. Tuy nhiên, sự khác biệt này không lớn và chưa có ý nghĩa thống kê. Như vậy, có thể khai thác những cây thuốc này ở cả 3 khu vực trên mà không có sự khác biệt lớn về hàm lượng flavonoid toàn phần.

Từ kết quả nghiên cứu về flavonoid, đề tài tiến hành sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết cây thuốc này trên *in vitro*. Hai chỉ số để đánh giá tác dụng chống oxy hóa thường được sử dụng là DPPH và MDA [5]. Thông qua xác định hàm lượng những chất này bằng phương pháp đo mật độ quang, có thể đánh giá được tác dụng chống oxy hóa. Dịch chiết các cây thuốc đều có hoạt tính chống oxy hóa, trong đó cao nhất với DPPH là Đở ngọn (HCO = 70,34%), còn với MDA là dịch chiết Hạ khô thảo (71,25%). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả định flavonoid toàn phần có trong dịch chiết, chứng tỏ có mối liên quan giữa hàm lượng flavonoid với hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết cây thuốc được thu hái ở khu vực đồi núi Hà Nội.

KẾT LUẬN

- Các cây thuốc có tác dụng chống oxy hóa đều có chứa flavonoid. Trong đó, cây có hàm lượng cao flavonoid là Chè, Đỏ ngon, Rau má (> 3%). Các cây có hàm lượng thấp là Thổ phục linh (0,67%). Hàm lượng flavonoid toàn phần của mỗi cây thu hái ở những khu vực khác nhau có sự khác biệt, tuy nhiên sự khác biệt này không rõ rệt.

- Dịch chiết của những cây thuốc nghiên cứu đều có tác dụng chống oxy hóa thể hiện trên 2 thử nghiệm DPPH và nồng độ hàm lượng MDA. Trong đó, dịch chiết cây Đỏ ngon có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn dịch chiết của các cây còn lại, HTCO % tương ứng là 70,34 % và 68,76%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Đỗ Tất Lợi*. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học. 2005.
2. *Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Viết Tự*. Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. NXB Y học. Hà Nội. 1985.
3. *Viện Dược liệu*. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. NXB Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội. tập I, II. 2004.
4. *Trần Lưu Vân Hiến*. Tính chất hóa lý và sinh học của bioflavonoid chiết xuất từ cây kim ngân (*Lonicera dasystyla*). Luận án Phó Tiến sỹ Khoa học Y Dược. Trường Đại học Dược khoa Hà Nội. 1992.
5. *Đoàn Thị Nhu, Đỗ Trung Đàm, Phạm Duy Mai, Nguyễn Thương Đông, Nguyễn Thị Thu Hương*. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. NXB Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội. 2006.
6. *Cheseman K.H*. Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues. J Biol Chem. 1985, 235, pp.507-514.
7. *Stroev E.A, Makarova V.G*. Determination of lipid peroxidation rate in tissue homogenate laboratory. Manual in Biochemistry. 1989, pp.243-256.