

## GÓP PHẦN NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT CÂY ĐĂNG SÂM VIỆT NAM Ở SA PA - LÀO CAI

Hoàng Minh Chung<sup>1</sup>, Phạm Xuân Sinh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Hà nội, <sup>2</sup>Trường Đại học Dược Hà nội.

(Nhận bài ngày 7 tháng 4 năm 2003)

### Summary

#### Contribution to the Study on Botanical Characteristics of Dangshen Collected in Sa Pa - Lao Cai

Several species are used under the name of Dangshen. In Sa Pa (Lao Cai province), at least two species occur, a wild one and an imported one. The wild species (also cultivated in Sa Pa Medicinal Plant Station) has been identified as *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. but the other still needs further investigation.

Keyword: Wild Dangshen, Identification, *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f.

#### 1. Đặt vấn đề

Đăng sâm là vị thuốc bổ khí đã được dùng từ lâu trong y học cổ truyền Trung Quốc, Việt Nam, Lào... Đó là rễ củ của một số loài thuộc chi *Codonopsis* Wall. và *Campanumoea* Blume [15]. Trên thế giới, chi *Codonopsis* Wall. có 44 loài, phân bố chủ yếu từ đông Himalaya đến Nhật Bản [13], trong đó riêng ở Trung Quốc có 25 loài được dùng làm thuốc là *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. (đăng sâm), *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L.T. Shen. (tố hoa đăng sâm), *C. tangshen* Oliv. (xuyên đăng sâm), *C. lanceolata* Benth. et Hook.f. (dương nhũ sâm). Chi *Campanumoea* Blume có 3 loài, trong đó 2 loài *Campanumoea javanica* Blume (thổ đăng sâm) và *C. lanceolata* Sieb. et Zucc. được Joseph Dalton Hooker và Trautv chuyển sang chi *Codonopsis* Wall.

Cây đăng sâm mọc hoang ở Việt Nam được mô tả trong các tài liệu với tên khoa học là:

+ *Campanumoea javanica* Blume [3, 4, 16].

+ *Codonopsis* sp. [7]

+ *Codonopsis javanica* (Blume) Hook .f. [2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13].

Trong quá trình nghiên cứu về cây này, chúng tôi thấy ở Trạm nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa (Viện Dược liệu) có trồng 2 loài đăng sâm ở vườn mẫu. Một loài là cây nhập trồng, còn loài kia lấy từ

thiên nhiên.

Từ đó, chúng tôi muốn kiểm tra và xem xét cụ thể hơn về tên khoa học và một vài đặc điểm sinh học của cây đăng sâm mọc hoang.

#### 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu:

Cây đăng sâm mọc hoang ở xã Bản Khoang, thị trấn Sa Pa, huyện Sa Pa và ở huyện Than Uyên, tỉnh Lào Cai.

Cây đăng sâm nhập trồng ở vườn của Trạm nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa (Viện Dược liệu).

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp mô tả hình thái, đối chiếu với khoá phân loại chi *Codonopsis* Wall. để xác định loài [3,6,15,16].

#### 3. Kết quả nghiên cứu

##### 3.1. Hình thái thực vật của đăng sâm mọc hoang:

Qua nghiên cứu đầy đủ hoa và quả của các mẫu đăng sâm thu thập ở cây mọc hoang cũng như được trồng ở vườn của Trạm nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa, chúng tôi thấy có sự khác biệt rất rõ ràng giữa các cây đăng sâm mọc hoang và cây đăng sâm nhập trồng.

Căn cứ vào các khoá phân loại hiện có [3,6,15,16], có thể khẳng định cây đăng sâm mọc

hoang ở khu vực Sa Pa và Than Uyên, tỉnh Lào Cai thuộc loài *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. (syn. *Campanumoea javanica* Blume). Sau đây là bản mô tả tóm tắt đặc điểm hình thái của loài đảng sâm mọc hoang và loài nhập trồng.

### 3.1.1 Đảng sâm mọc hoang:

- *Campanumoea javanica* Blume Bijdn. Fl., Nederl. Ind.:727 (1826); Danguy in Lecomte, Fl. Gen. Indoch. 3: 696-697 (1922) – *Campanumoea*; Craib, Fl. Siam. Enum. 2: 307 (1936).

- *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f., 1855.

- *Campanumoea cordata* Maxim. Bull. Ac. Imp. Sc. Peferb. 12: 68 (1868).

- *C. japonica* auct. Maxim., Bull. Ac. Imp. Sc. Peferb. 12: 67 (1868) non Siebold et Morren 1863.

- *C. cordifolia* Komarov, Act. Horf. Petrop. 29: 108 (1908).

- *Campanumoea javanica* Blume [16]

- *C. maximowiczii* Honda, Bot. Mag. Tokyo 50: 389 (1936).

Tên Việt Nam: Đảng sâm, sâm nam, mần rày cáy (Tày), cang hô (H'Mông)...

Cây cỏ, sống nhiều năm, leo bằng thân quấn, phân cành, dài 1,5-2,5 m, có rễ củ nạc. Toàn cây có nhựa màu trắng như sữa, ngọn và lá non thường có lông mịn, khi già nhẵn.

Lá mỏng, mọc đối hoặc so le (ở phần ngọn khi có hoa), hình tim thuôn dài 3-6 cm, rộng 2,5-5 cm, gốc xẻ thành 2 thùy tròn sâu, đầu nhọn hoặc tù, mặt dưới nhạt, có lông nhỏ, gân nổi rõ, mép nguyên, hơi lượn sóng; cuống lá dài 1-3 cm. Khi vò nát, lá không có mùi hôi.

Hoa mọc riêng lẻ ở kẽ lá, có cuống dài 1,2-2 cm; đài có 5 phiến hẹp, dài 1-1,5 cm, dính nhau ở gốc; tràng hình chuông, đường kính 1-2 cm; 5 cánh hoa màu trắng ngà hoặc hơi vàng; nhị 5, chỉ nhị hơi dẹt, bao phấn dính gốc; bầu trên, 5 ô, noãn dính giữa, nhụy có đầu dạng đĩa.

Quả mọng, gân hình cầu, có 5 cạnh mờ, đường kính 1-1,5 cm, đầu hơi dẹt, hình ngũ giác do vết tích của 5 cánh hoa còn lại, ở giữa có núm nhọn nhỏ, khi chín màu tím hoặc tím đen, dài tồn tại; hạt nhỏ, nhiều, nhẵn, màu vàng nâu hoặc hơi tím. Mùa hoa: tháng 8-9; mùa quả: tháng 10-11 (12).

Rễ hình trụ, mọc thẳng trong đất, phía dưới thường phân nhánh, kích thước thay đổi theo tuổi cây và nơi mọc. Rễ nạc, màu trắng ngà, giữa có lõi

gỗ, có nhựa mủ màu trắng như sữa, khi khô dễ bẻ, màu vàng nâu nhạt, mùi thơm, vị hơi ngọt (ảnh 1-bìa 4).

### 3.1.2 Đảng sâm nhập trồng:

Cây cỏ, sống nhiều năm, leo bằng thân quấn, dài 1-1,5 m. Thân màu xanh lục điểm những đốm tím, có nhiều lông và nhựa mủ trắng như sữa. Lá mọc đối, hình trứng, rộng hay hẹp, dài 1,5-3 cm, rộng 1-2,5 cm, gốc hình tim, mép lượn sóng, có một lớp lông trắng, mặt trên màu xanh sẫm có lông thưa, mặt dưới nhạt như có phấn trắng và lông ngắn dày, vò ra có mùi hôi. Hoa mọc ở kẽ lá hay đầu cành; đài rất phát triển, dài 1,2-1,5 cm; tràng hình chuông, dài 1-1,5 cm, đường kính 0,8-1,2 cm, có 5 cánh màu vàng nhạt có điểm tím; nhị 5, chỉ nhị dài gần dưới bầu, 2 bao phấn; bầu trên có 3 ngăn, đầu nhụy chia 3. Quả hình chùy, mặt trên có hình ngũ giác rất rõ, ở giữa có chóp nón nhọn; hạt nhiều, hình kim, màu đen bóng. Mùa hoa: tháng 10-11; mùa quả: tháng 11-12.

Rễ hình trụ, dài 8-15 cm, màu vàng xám, bề mặt nhẵn hoặc sù sù, có vân ngang, phía dưới có thể phân nhánh, đầu rễ củ còn sót lại nhiều vết thân, có nhựa mủ trắng như sữa; khi khô dẻo hơn loại mọc hoang, mùi thơm nhẹ, vị hơi ngọt.

Cây này có các đặc điểm thực vật của chi *Codonopsis* Wall. (ảnh 2-bìa 4).

## 4. Bàn luận

Loài *Campanumoea japonica* được Blume công bố lần đầu tiên năm 1826, trong bộ Flora of the Netherlands. Đến năm 1855, căn cứ vào dạng quả (mọng hay thịt) của loài, Joseph Dalton Hooker đã chuyển nó sang chi *Codonopsis* Wall. (chi *Campanumoea* Blume không có các dạng quả kể trên) và vẫn giữ tên loài như Blume đã đặt (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f.) [15]. Năm 1922, trong bộ "Thực vật chí tổng quan Đông Dương", tập 3, Paul Danguy đã mô tả cây đảng sâm ở Việt Nam dưới tên chi *Campanumoea*, nhưng vẫn lấy tên loài là *javanica*. Cách gọi tên chi theo kiểu này có lẽ vẫn xuất phát từ *Campanumoea* (hoa hình chuông). Mặc dù vậy, ông vẫn thừa nhận chi *Campanumoea* có dạng quả mọng, khi già mở theo các đường gờ trên quả [16].

Có thể từ một số thông tin kể trên, nên không ít tác giả Việt Nam có cách gọi tên cây đảng sâm ở nước ta chưa thống nhất với nhau [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15]. Đến năm 1969, khi biên tập bổ sung và sửa chữa họ *Campanulaceae* (trong Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam, J. 9)

Nguyen Van Thuan đã đồng ý với quan điểm của Joseph Dalton Hooker để xác định cây đẳng sâm mọc tự nhiên ở Việt Nam (Sa Pa, Kon Tum, Tuyên Đức) là *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f.) [15]. Quan điểm này cũng được nhiều tác giả Việt Nam gần đây thừa nhận.

Khi nghiên cứu tất cả các mẫu đẳng sâm mọc hoang ở Sa Pa, Than Uyên (Lào Cai), cũng như các mẫu khác hiện đang lưu trữ tại khoa Tài nguyên – Viện Dược liệu, chúng tôi cũng cho rằng chúng thuộc loài *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. kể trên.

## 5. Kết luận

Qua nghiên cứu cây đẳng sâm ở khu vực Sa Pa (Lào Cai) và vùng lân cận, bước đầu chúng tôi thấy ít nhất có 2 loài:

+ Loài đẳng sâm mọc hoang ở xã Bản Khoang, thị trấn Sa Pa huyện Sa Pa và huyện Than Uyên có tên khoa học là *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f., 1855. Loài này cũng được thu thập trồng ở vườn mẫu của Trạm nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa.

+ Loài đẳng sâm nhập trồng ở vườn mẫu của Trạm nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa cũng có các đặc điểm của chi *Codonopsis* Wall. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi chưa có điều kiện xác định cụ thể tên loài.

## Tài liệu tham khảo

- 1). Đỗ Huy Bích, 1995. Thuốc từ cây cỏ và động vật; Nhà xuất bản Y học; tr 190; 2). Võ Văn Chi 1997. Từ điển cây thuốc Việt Nam; Nhà xuất bản Y học số 21; tr 444; 3). Vũ Văn Chuyên 1976. Tóm tắt đặc điểm các họ cây thuốc, Nhà xuất bản Y học; tr 35; 4). Dược Điển Việt Nam in lần thứ nhất 1983. Nhà xuất bản Y học Tập II; tr 133 - 134; 5). Dược Điển Việt Nam 3, 2002; Nhà xuất bản Y học; tr 359; 6) Phạm Hoàng Hộ 2000; Cây cỏ Việt Nam quyển III, số 8099; tr 101; 7). Đỗ Tất Lợi 1999. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam; Nhà xuất bản Y học; tr 811; 8). Nguyễn Nghĩa Thìn 1998; Đa dạng thực vật có ở mạch núi cao Sa Pa; Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội; 9). Từ điển bách khoa dược học 1999. Nhà xuất bản từ điển bách khoa; tr 206 - 207; 10). Viện Dược liệu 1993. Tài nguyên cây thuốc Việt Nam; Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật; tr 369; 11). Viện Dược liệu 1990. Cây thuốc Việt Nam; Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; tr 135; 12). World Health organization 1998: Quality control methods for medicinal plant materials; P 10 - 17; 13). Institute of Materia Medica Hanoi - Vietnam 1999: Selected Medicinal Plants in Vietnam; Science and Technology Publishing House; Volume I; p 211 - 216, 232; 14). Beijing University of Traditional Chinese Medicine 1998; The Chinese Materia Medica, Academy press; P 273 - 275; 15). Nguyen Van Thuan , 1969. Campanulaceae, in Flore du Cambodge du Laos et du Vietnam, Fas. 9; Muséum National D'histoire Naturelles, Paris; P.3-12; 16). Paul Danguy, 1922; in: M. H. Lecomte, Flore général de L'Indo-China; T.3; Paris, Masson et C<sup>ie</sup> Éditeurs; p 686-697.

*Tap chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 99-103)*

## NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY BA KÍCH

*Vũ Hoài Sâm, Phạm Văn Hiến*

*Viện Dược liệu*

(Nhận bài ngày 3 tháng 5 năm 2003)

### Summary

#### *In Vitro* Mass Multiplication of *Morinda officinalis* How (Rubiaceae)

*This is the first report of a micropropagation protocol for Morinda officinalis How (Rubiaceae), a valuable, threatened and near-endemic medicinal plant in Vietnam. Aseptic shoot cultures were established from single-node stem cuttings taken from 3-year old, field growing plants on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg/l Kin. 100 % of the shoot apices and single-node stem cuttings (1-1.5 cm long) from these aseptic in vitro shoots gave rise to multiple shoots on being cultured in MS medium containing 3 mg/l BAP. Shoots arose both directly from axillary buds and indirectly from the periphery of the basal callus of the explants. Maximum rates of multiplication averaging  $18.80 \pm 8.99$  and  $23.52 \pm 9.26$  were obtained for shoot apices and stem cuttings,*

respectively. The basal callus portions grew continuously giving more and more healthy shoots, therefore, can be used for subcultures. Rooting of the single shoots was inhibited by both NAA and IBA at concentrations from 0.1 mg/l to 0.5 mg/l. 50-60% in vitro rooting was obtained in MS medium without any growth regulators in about 30 days and plantlets were successfully transferred to PE bags.

*Key words: Morinda officinalis* How (Rubiaceae), *In Vitro* Mass Multiplication.

## Mở đầu

Theo y học cổ truyền, ba kích (*Morinda officinalis* How - Rubiaceae) là vị thuốc có tác dụng bổ trí não, trợ dương, ích tinh, mạnh gân cốt, chữa các bệnh về tinh dục, người già mệt mỏi, kém ăn, ít ngủ nhưng không có biểu hiện bệnh lý. Đặc biệt, tuy giúp bình thường hoá và cải thiện tình dục nhưng ba kích không kích dục, không có tác dụng kiểu androgen và không độc [9]. Gần đây, thành phần hoá học [10] và nhiều tác dụng dược lý mới của ba kích cũng đã được phát hiện như chống stress [4], chống trầm cảm [5,11] và chống oxy hoá [8].

Với phương châm "phòng bệnh hơn chữa bệnh" của ngành y tế, việc nghiên cứu sản xuất các loại thuốc bổ để tăng cường sức khoẻ và ngăn ngừa bệnh tật cho cộng đồng ngày càng được đẩy mạnh. Trong bối cảnh đó, ba kích đang trở thành một trong những cây thuốc bản địa độc đáo của nước ta. Mặt khác, đó là cây chỉ thích hợp để trồng xen ở đất đồi, không phải cạnh tranh với các cây trồng khác, vì vậy, nó có ý nghĩa to lớn trong việc tăng thu nhập cho đồng bào vùng cao.

Trước những năm 70, nguồn ba kích chỉ dựa vào việc khai thác tự nhiên từ rừng thuộc một số tỉnh phía Bắc như Tuyên Quang, Yên Bái, Phú Thọ, Lạng Sơn, Hà Bắc, Quảng Ninh, Hoà Bình và Hà Tây [2]. Do nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng, nên ba kích mọc hoang bị khai thác ngày càng kiệt quệ. Mặt khác, rừng ở các vùng phân bố của ba kích bị tàn phá nghiêm trọng khiến cây lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng, được ghi vào Sách Đỏ Việt Nam [1]. Vì vậy, việc nghiên cứu trồng cây ba kích là con đường duy nhất để duy trì và phát triển nguồn thuốc quý này.

Nhưng hiện nay, vấn đề nhân giống là một tồn tại, cản trở việc mở rộng diện tích trồng ba kích. Cây trồng sau 15 tháng mới có 3,5% số cây ra hoa và sau 22 tháng mới có 1,2% số cây đậu quả. Sau 3 năm, tỷ lệ này cũng chỉ đạt khoảng 30% và hệ số nhân giống bằng hạt chỉ đạt 1,1/năm. Ba kích cũng có thể nhân giống bằng giâm cành, nhưng hệ số nhân của phương pháp này chỉ đạt 0,61/năm, mặc dù đã sử dụng các chất kích thích sinh trưởng [3]. Tóm lại, các phương pháp nhân giống truyền thống

như gieo hạt, giâm cành không thể đáp ứng nhu cầu về cây giống để phát triển trồng ba kích, ít nhất là trong vòng 15-20 năm tới, chưa kể đến những hạn chế của các phương pháp này đối với sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây trồng. Vì vậy, việc sử dụng công nghệ tế bào thực vật để nhân nhanh ba kích là yêu cầu rất cấp bách. Bài viết này trình bày kết quả nghiên cứu tái sinh chồi và tạo rễ từ ngọn chồi và lát cắt của đốt thân ba kích.

## Nguyên liệu và phương pháp

Ngọn chồi và đốt thân (dài 1-1,5 cm) lấy từ cây ba kích 3 năm tuổi trồng ngoài đồng được rửa sạch bằng nước xà phòng loãng, ngâm thuốc diệt nấm và khử trùng bề mặt bằng  $HgCl_2$  0,07% trong 10 phút, tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng rồi cấy vào môi trường dinh dưỡng Murashige và Skoog (MS) [6] có cải tiến. Các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung vào môi trường cơ bản với các tổ hợp và nồng độ khác nhau. Mỗi công thức thí nghiệm được quan sát ít nhất 12 mẫu. Phòng nuôi được duy trì ở nhiệt độ 25 - 27°C, độ ẩm  $\leq 70\%$ , cường độ chiếu sáng 2000 lux với chu kỳ chiếu sáng 14 giờ /ngày. Số liệu được xử lý theo Microsoft Excel (Anova).

## Kết quả và thảo luận

### Cấy khởi động

Ngọn chồi và đốt thân lấy từ cây ba kích trồng trong vườn rừng ở Thanh Hoá, sau khi khử trùng được nuôi cấy trong các môi trường MS+0.1 mg/l NAA; MS+0,5 mg/l NAA; MS+1 mg/l NAA; MS+0,1 mg/l Kin; MS+0,5 mg/l Kin; MS+1 mg/l Kin và MS.

Kết quả cho thấy tất cả các ngọn chồi đều bị chết do khử trùng (giảm thời gian xử lý hoặc nồng độ  $HgCl_2$  đều không thu được mẫu vô trùng). Đối với đốt thân, số liệu giữa các lần thí nghiệm không nhất quán vì mẫu bị nhiễm nấm/khuẩn nội sinh khá nặng. Hơn nữa, vị trí của đốt thân vốn không đồng nhất về trạng thái sinh lý cũng có thể ảnh hưởng đến chiều hướng hoặc mức độ phát sinh hình thái. Trong số các môi trường đã thử, chỉ có môi trường MS+0,5 mg/l Kin là thích hợp cho việc tạo chồi, mặc dù không có cụm chồi, chồi sinh

trường chậm và mặt cắt có mô sẹo. Chúng tôi đã dùng môi trường này để cấy khởi động nhằm tạo ra một số lượng chồi đủ lớn, sạch bệnh, tương đối đồng đều về mặt sinh lý cho những nghiên cứu tiếp theo.

*Nghiên cứu tạo cụm chồi*

Ngon chồi và đốt thân dài khoảng 1 cm lấy từ chồi *in vitro* được cấy vào môi trường dinh dưỡng gồm khoáng, vitamin, đường, thạch theo MS có bổ sung BAP với các nồng độ 0,5, 1, 2, 3 và 5 mg/l. Kết quả theo dõi 75 ngày sau khi cấy được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi của mẫu cấy

| Nồng độ BAP mg/l | Tỷ lệ tạo cụm chồi (%) | Số chồi/ mẫu (chiếc)           | Chiều cao chồi (cm) |
|------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <b>Ngon chồi</b> |                        |                                |                     |
| 0,5              | 100                    | 6,92±3,58                      | 5,50±2,61           |
| 1,0              | 100                    | 9,75±4,45                      | 4,64±2,86           |
| 2,0              | 100                    | 8,38±4,96                      | 4,04±2,15           |
| 3,0              | 100                    | 18,80±8,99                     | 3,76±1,93           |
| 5,0              | 100                    | 9,69±6,96                      | 3,35±2,37           |
|                  |                        | F=7,87; F <sub>01</sub> =3,65  |                     |
| <b>Đốt thân</b>  |                        |                                |                     |
| 0,5              | 100                    | 8,87±4,12                      | 5,62±2,01           |
| 1,0              | 100                    | 12,22±4,89                     | 4,54±1,94           |
| 2,0              | 100                    | 10,60±4,72                     | 4,10±1,76           |
| 3,0              | 100                    | 23,52±9,26                     | 3,68±1,32           |
| 5,0              | 100                    | 14,00±6,71                     | 3,21±2,08           |
|                  |                        | F=14,28; F <sub>01</sub> =3,57 |                     |

Bảng 1 cho thấy 100% ngon chồi và đốt thân đều hình thành cụm chồi ở tất cả các môi trường nuôi cấy. Quá trình này bắt đầu khoảng 20 ngày sau khi cấy.

Lúc đầu, một khối mô sẹo nhỏ xuất hiện từ mặt dưới của lát cắt. Sau đó, nhiều chồi mới tiếp tục hình thành ở hai kẽ lá (dưới cùng, đối với ngon chồi). Về sau, chồi được hình thành cả từ phía ngoài của khối mô sẹo. Như vậy, chồi ba kích được hình thành thông qua cả con đường tái sinh trực tiếp lẫn gián tiếp.

Đối với cả hai loại mẫu cấy, chồi đều sinh trưởng khá tốt thể hiện qua các chỉ tiêu: số chồi/mẫu và chiều cao chồi, tùy thuộc vào nồng độ của BAP trong môi trường. Ở nồng độ BAP = 3mg/l, cả hai loại mẫu cấy đều cho số chồi/mẫu cao nhất, trong đó, đốt thân có số chồi nhiều hơn

so với ngon chồi. Điều này có thể do ngon chồi còn chịu ảnh hưởng của ưu thế ngọn.

Khi nồng độ BAP tăng đến ngưỡng tối ưu (3mg/l), chiều cao của chồi giảm dần, nhưng vẫn đạt chiều cao cần thiết cho việc tách chồi để cấy truyền. Vượt quá ngưỡng này, cả số chồi/mẫu lẫn chiều cao của chồi đều giảm và bắt đầu có biểu hiện mọng nước (vitrification). Căn cứ vào kết quả của thí nghiệm này, chúng tôi đã chọn môi trường MS + 3mg/l BAP để tạo cụm chồi ba kích. Ở môi trường này, tuy hệ số nhân chồi đạt khá (18,8 ở ngon chồi và 23,52 ở đốt thân) nhưng độ biến động giữa các mẫu tương đối lớn, thể hiện ở độ lệch chuẩn cao. Thực tế có những mẫu cho đến 40 chồi, nhưng có mẫu chỉ đạt 5-7 chồi. Muốn tăng hệ số nhân, cần nghiên cứu tăng độ đồng đều của mẫu.

Sau khi thu hoạch tất cả các lát cắt đốt thân và

ngọn chồi, phần gốc còn lại của cụm chồi cũng được sử dụng để cấy truyền. Đáng chú ý là các khối mô này càng ngày càng to và cho nhiều chồi hơn. Cụm chồi tái sinh từ các gốc này thường sinh trưởng nhanh, khỏe và lá to hơn so với chồi tái sinh từ đốt thân và ngọn chồi (ảnh 1a,b,c).

#### Nghiên cứu tạo rễ

Các chồi đơn (đều không có rễ) dài ít nhất 3 cm, có 3 đôi lá trở lên được tách từ cụm chồi và cấy vào các môi trường gồm MS và NAA hoặc IBA ở các nồng độ 0,1 và 0,5 mg/l. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy cả NAA và IBA ở các nồng độ đã thử đều ức chế quá trình ra rễ của chồi ba kích. Tác dụng ức chế của NAA mạnh hơn so với IBA. Hiện tượng này có thể do chồi tiếp xúc với auxin quá lâu, làm cho quá trình bắt mầm rễ (outgrowth of root primordia) bị ức chế [7]. Để kiểm tra lại tác dụng này, chúng tôi đã tiến hành thêm loạt thí nghiệm sau đây: Chồi đủ tiêu chuẩn như trên được cấy vào các môi trường: MS, MS + 0,05 mg/l NAA + 0,05 mg/l IBA, MS + 0,05 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA, MS + 0,1 mg/l NAA + 0,05 mg/l IBA, MS + 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA và MS + 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA + 0,05 mg/l Kin. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3 khẳng định tác dụng ức chế của auxin đối với quá trình ra rễ của ba kích. Auxin rõ ràng làm giảm đáng kể tỷ lệ ra rễ, nhưng chỉ cần một lượng nhỏ cytokinin đã có thể cải thiện được tác dụng ức chế của auxin.

Tóm lại, auxin ở những nồng độ đã thử không những không cần thiết mà còn ức chế quá trình ra rễ của ba kích: Chồi ba kích ra rễ tốt nhất ở môi trường không chứa chất điều tiết sinh trưởng (ảnh 1d). Tuy nhiên, ở điều kiện này tỷ lệ ra rễ cũng chỉ đạt 50-60%. Việc cải thiện tỷ lệ ra rễ cần được nghiên cứu sâu hơn.

#### Nghiên cứu đưa cây ra bầu

Tuy quy trình nhân văn chưa hoàn thiện, nhưng chúng tôi đã thử chuyển một số cây ra bầu ươm với giá thể đất + trấu hun (1:1), phủ kín bằng màng PE và phun ẩm hàng ngày. Sau 10 ngày, cây đã ra rễ mới và sinh trưởng bình thường với tỷ lệ sống đạt



**Ảnh 1.** Tạo cụm chồi ba kích từ ngọn chồi (a), đốt thân (b) và phần gốc (c, 60 ngày sau khi cấy). Chồi ba kích ra rễ trong môi trường không có chất ĐHT (d, 30 ngày sau khi cấy). Cây ba kích *in vitro* trồng trong bầu (60 ngày sau khi cấy)

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự hình thành rễ ba kích trong ống nghiệm

| Thành phần môi trường | Tỷ lệ ra rễ (%) 30 ngày sau khi cấy | Tỷ lệ ra rễ (%) 60 ngày sau khi cấy |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| MS                    | 53,3                                | 66,7                                |
| MS + 0,1mg/l NAA      | 47,1                                | 64,7                                |
| MS + 0,5 mg/l NAA     | 31,3                                | 43,8                                |
| MS + 0,1 mg/l IBA     | 56,3                                | 56,3                                |
| MS + 0,5 mg/l IBA     | 50,0                                | 50,0                                |

70-80% (ảnh 1e).

#### Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu đã nêu trên, có thể rút ra các kết luận sau:

**Bảng 3.** Kiểm tra tác dụng ức chế ra rễ ba kích của auxin

| Thành phần môi trường                          | Tỷ lệ ra rễ (%) 30 ngày sau khi cấy |
|--|-------------------------------------|
| MS   | 62,5                                |
| MS + 0.05mg/l NAA + 0,05mg/l IBA               | 58,8                                |
| MS + 0,05 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA              | 47,1                                |
| MS + 0,1 mg/l NAA+ 0,05mg/l IBA                | 42,4                                |
| MS + 0,1mg/l NAA+ 0,1mg/l IBA                  | 33,3                                |
| MS + 0.1mg/l NAA + 0,1mg/l IBA + 0,05 mg/l Kin | 42,1                                |

1. Có thể dùng môi trường MS + 0,5 mg/l Kinetin để cấy khởi động (tái sinh chồi sơ cấp từ) đốt thân ba kích.
2. BAP cần và đủ để tái sinh cụm chồi cây ba kích với nồng độ thích hợp nhất là 3.0 mg/l.
3. Ngọn chồi, đốt thân và phần gốc đều có thể sử dụng để nhân cụm chồi.
4. Chồi ba kích ra rễ tốt nhất trong môi trường không có chất điều tiết sinh trưởng.
5. Sau khi tạo rễ trong ống nghiệm, cây con có thể chuyển ra giá thể đất + trấu hun (1:1) khá dễ dàng.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Chủ nhiệm đề tài KC04-08 thuộc chương trình CNSH cấp Nhà nước giai đoạn 2001-2005 đã cấp kinh phí và giúp đỡ thực hiện công trình nghiên cứu này.

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Bộ KHCN & MT. *Sách đỏ Việt Nam*. NXB KHKT, Hà nội, 1996; 2). Nguyễn Chiêu et al. *Thông báo Dược liệu* 10, 30. 1978; 3). Nguyễn Chiêu. *Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp Bộ KHYD 02-21R - Viện Dược liệu*, 2001; 4). Li YF, Yuan L, Xu YK, Yang M, Zhao YM, Luo ZP. *Acta Pharmacol. Sin.* 2001, 22(12):1084-8; 5). Li YF, Gong ZH, Yang M, Zhao YM, Luo ZP. *Life Sci.* 2003, 72(8): 933-42; 6). Murashige, T. and F. Skoog. 1962. *Physiol. Plant.* 15: 473-97; 7). Pierik, R. L. M. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, 1987. p. 206; 8). Soon, Y. Y., Tan, B. K. H. *Singapore Medical Journal* 2002, 43(2): 77-85; 9). Viện Dược liệu. *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. NXB KHKT, Hà Nội, 1993; 10). Yoshikawa M, Yamaguchi S, Nishisaka H, Yamahara J, Murakami N. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 1995, 43(9): 1462-5; 11). Zhang ZQ, Yuan L, Yang M, Luo ZP, Zhao YM. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002, 72(1-2): 39-43.

*Tap chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 103-107)*

## PHÂN LẬP FLAVONOID TỪ CÂY ĐƠN LÁ ĐỎ

<sup>1</sup>Nguyễn Thái An, <sup>1</sup>Phạm Xuân Sinh, <sup>2</sup>Chu Đình Kính  
<sup>1</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội; <sup>2</sup>Viện Hoá học-Trung tâm KHTN&CNQG  
(Nhận bài ngày 20 tháng 2 năm 2003)

### Summary

#### Isolation of Flavonoids from *Excoecaria cochinchinensis* Lour. var. *cochinchinensis*

Two flavonols, kaempferol and kaempferol 7-O-glycoside, were isolated from the leaves of *Excoecaria cochinchinensis* Lour. for the first time. Their structures were elucidated on the basis of spectral analysis including EIMS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR.

Key words: *Excoecaria cochinchinensis* Lour. var. *cochinchinensis*, Kaempferol, Kaempferol 7-O-glycoside.

## 1. Đặt vấn đề

Trong công trình nghiên cứu thành phần hoá học của cây đơn lá đỏ, một vị thuốc nam được dùng phổ biến trong dân gian để điều trị các trường hợp dị ứng, mụn nhọt, mẩn ngứa..., chúng tôi đã xác định các nhóm chất có mặt trong lá [1], đồng thời lần đầu tiên đã phân lập được 2 thành phần acid gallic (FAD1) và acid ellagic (FAD2) từ dịch chiết methanol [2], [3].

Bài báo này trình bày kết quả chiết tách tiếp theo và xác định cấu trúc của kaempferol từ đơn lá đỏ.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu.

- Nguyên liệu: Lá cây đơn lá đỏ thu hái ở Hà Nội và Thái Bình được giáo sư Vũ Văn Chuyên xác định tên khoa học là *Excoecaria cochinchinensis* Lour., họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).

- Phổ tử ngoại được đo trên máy UV – VIS Spectrophotometer Cary IE – Varian (Australia) và phổ hồng ngoại trên máy FT – IR Spectrophotometer 1650 – Perkin Elmer (USA) ở phòng thí nghiệm trung tâm, Trường Đại học Dược Hà Nội.

- Phổ khối được đo trên máy 5989B – MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , COSY, DEPT, HMBC, HMQC trên máy đo phổ NMR Bruker – 500MHz, dung môi DMSO- $d_6$  ở phòng Cấu trúc – Viện Hoá học – TTKHTN & CNQG.

### Chiết xuất và phân lập

Bột dược liệu (500g) được chiết bằng MeOH ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết MeOH được bay hơi dung môi dưới áp suất giảm cho đến khô. Hoà cần (120g) vào 250ml nước và đem lắc lần lượt với cloroform, ethyl acetat (EtOAc), aceton-nước (AW)(6:1).

Dịch chiết ethyl acetat được cất loại dung môi thu được cần màu vàng nâu. Cần (5g) được đưa lên cột silica gel G 60, cỡ hạt 100 – 160  $\mu\text{m}$  (Merck) để phân lập, rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CHCl}_3$  : MeOH với tỷ lệ giảm dần. Các phân đoạn (5 phân đoạn) thu được để bay hơi dung môi, tiếp tục được phân lập và tinh chế lại trên sắc ký cột Sephadex LH-20, rửa giải bằng MeOH ở các tỷ lệ khác nhau. Phân đoạn II', III' cho cần màu vàng đậm sau khi tinh chế lại trên cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng methanol 60% lần lượt thu được FAD8 (15mg) và FAD7 (12mg).

### Nhận dạng chất phân lập

Sau khi khai triển với 4 hệ dung môi khác nhau, FAD7 và FAD8 chỉ xuất hiện một vết trên sắc ký lớp mỏng và sắc ký giấy.

### Nhận dạng FAD7

\**Tính chất*: FAD7 có dạng tinh thể hình kim, màu vàng nhạt, tan tốt trong methanol, ethanol, diethyl ether, tan trong dung dịch kiềm và dung dịch acid, ít tan trong nước nóng, hầu như không tan trong nước lạnh, không tan trong benzen, cloroform.

+ Nhiệt độ nóng chảy: 276-278°C

+ *Phổ tử ngoại*: Có  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 266,6nm và 352,2 nm đặc trưng cho hợp chất flavonol.

+ *Phổ hồng ngoại*: được đo dưới dạng viên nén KBr.

FAD7 có các đỉnh hấp thụ mạnh ở 3425,9  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm phenol (-OH) 1730,7 và 1649,1  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm carbonyl (C=O) liên hợp không tạo cấu hydro; 1461  $\text{cm}^{-1}$  đặc trưng cho C=C nhân thơm.

+ *Phổ khối (EIMS)*: Pic ion phân tử [ $\text{M}^+$ ] với cường độ khá lớn ở  $m/z=286$ , tương ứng với công thức  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ . Ngoài ra, còn có sự tồn tại của các mảnh có số khối đặc trưng sau: Các pic mảnh có  $m/z$  lần lượt là: 258, 229, 213, 121, 93, 69.

Khả năng phân mảnh có thể xảy ra theo các xu hướng trình bày ở trang sau.

+ *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*:

$^1\text{H-NMR}$ : phổ proton  $^1\text{H-NMR}$  cho 4 tín hiệu doublet, trong đó có 2 tín hiệu, mỗi tín hiệu tương ứng với 2 proton, 2 tín hiệu còn lại, mỗi tín hiệu tương ứng với 1 proton. Proton của C-6 và C-8 đều xuất hiện 1 pic đôi (doublet) nằm trong vùng  $\delta$  6,2 – 6,6 ppm. Hằng số tương tác hoá học  $J_{\text{H-6} \dots \text{H-8}} = 2,6$  Hz.

Các tín hiệu của H-2', H-3', H-5' và H-6' nằm trong vùng  $\delta$  6,9 – 8,2 ppm. Tín hiệu doublet của H-3' và H-5' luôn ở về trường cao hơn so với doublet của H-2' và H-6'. Hằng số tương tác  $J_{\text{H-3} \dots \text{H-5}'} = J_{\text{H-2}' \dots \text{H-6}'} = 9$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ : Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của FAD7 cho 13 tín hiệu của 15 nguyên tử carbon (C-3' trùng C-5'; C-2' trùng C-6'). Độ dịch chuyển của các nguyên tử carbon trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho thấy FAD7 có cấu trúc đặc trưng của khung flavonol.

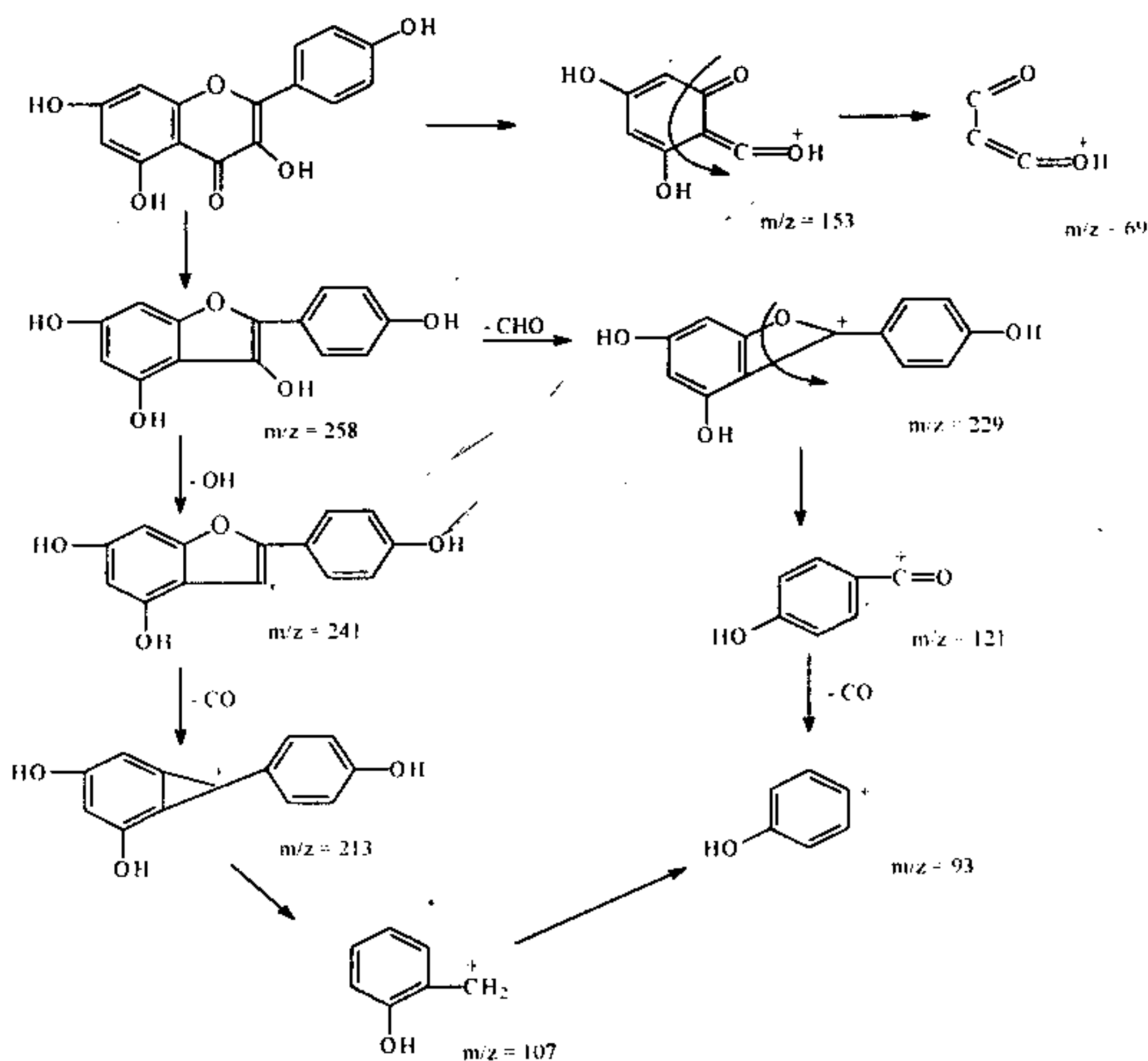
Tuy nhiên, trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  nằm trong vùng



từ 0 - 80 ppm có sự xuất hiện các tín hiệu của các carbon glycosid, điều này cho thấy FAD7 là một glycosid có phần aglycon là một flavonol. Dựa trên các dữ liệu phổ DEPT,  $^{13}\text{C}$ -NMR đo được có so sánh với dữ liệu phổ chuẩn [98], [129], và kết quả thủy phân - xác định cấu trúc đường của FAD7, nhận thấy FAD7 chứa 1 đơn vị đường glucose gắn tại C-7.

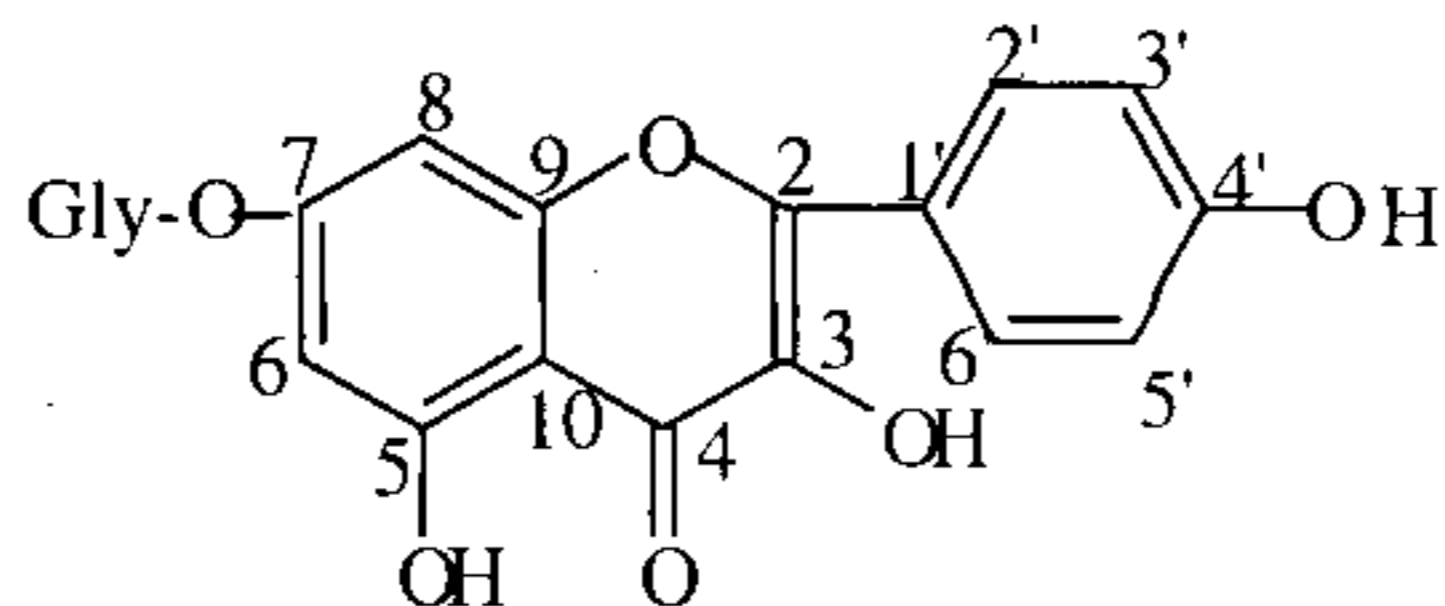
Kết quả phân tích phổ  $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR được trình bày ở bảng 1.

Từ kết quả phân tích các phổ UV, IR, MS,  $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR, có so sánh với dữ liệu phổ chuẩn [4,5], có thể kết luận FAD7 là một flavonol glycosid với công thức phần aglycon là  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$  và phần đường là glucose liên kết ở vị trí C-7. FAD7 có tên là kaempferol 7-O-glycosid.



**Bảng 1.** Số liệu phổ  $^1\text{H}$ -NMR và  $^{13}\text{C}$ -NMR của FAD7 (DMSO- $\text{D}_6$ ,  $\delta$  (ppm), 500 MHz)

| Vị trí carbon | $\delta_{\text{H}}$ (ppm) FAD7 | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) FAD7 |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 2             |                                | 158,4                          |
| 3             |                                | 132,4                          |
| 4             |                                | 179,4                          |
| 5             |                                | 163,1                          |
| 6             | 6,23 (H, d, J = 2,6 Hz)        | 100,02                         |
| 7             |                                | 166,3                          |
| 8             | 6,43 (H, d, J = 2,6 Hz)        | 94,8                           |
| 9             |                                | 161,6                          |
| 10            |                                | 105,6                          |
| 1'            |                                | 122,7                          |
| 2'            | 8,05 (H, d, J = 9 Hz)          | 132,2                          |
| 3'            | 6,91 (H, d, J = 9 Hz)          | 116,2                          |
| 4'            |                                | 158,5                          |
| 5'            | 6,91 (H, d, J = 9 Hz)          | 116,2                          |
| 6'            | 8,05 (H, d, J = 9 Hz)          | 132,2                          |



Hình 1. Cấu trúc của hợp chất FAD7: kaempferol 7-O-glycozid

#### Nhận dạng FAD8

\**Tính chất*: FAD8 có dạng tinh thể hình kim, màu vàng nhạt, tan tốt trong methanol, ethanol, diethyl ether, tan trong dung dịch kiềm và dung dịch acid, ít tan trong nước nóng, hầu như không tan trong nước lạnh, không tan trong benzen, cloroform.

+ *Nhiệt độ nóng chảy*: 274-276°C

+ *Phổ tử ngoại*: Có  $\lambda_{max}$  (MeOH): 272,2 nm và 368,9 nm đặc trưng cho hợp chất flavonol.

+ *Phổ hồng ngoại*: được đo dưới dạng viên nén KBr.

FAD8 có các đỉnh hấp thụ mạnh tại  $\nu$  3419,8  $cm^{-1}$  đặc trưng cho nhóm phenol (-OH); 1729,3 và 1607,9  $cm^{-1}$  đặc trưng cho nhóm carbonyl (C=O) liên hợp không tạo cầu hydro; 1461  $cm^{-1}$  đặc trưng cho C=C nhân thơm.

+ *Phổ khối (MS)*: Pic ion phân tử  $[M^+]$  với cường độ khá lớn ở  $m/z=286$ , tương ứng với công thức  $C_{15}H_{10}O_6$ . Ngoài ra, còn có sự tồn tại của các mảnh có số khối đặc trưng sau: Các pic mảnh có  $m/z$  lần lượt là 269, 258, 229, 213, 121, 97, 83.

Khả năng phân mảnh có thể xảy ra theo các xu hướng tương tự như FAD7.

+ *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR*:

-  $^1H$ -NMR: phổ proton  $^1H$ -NMR cho 2 tín hiệu doublet ở 6,19 ppm và 6,44 ppm. Ngoài ra, còn 1 tín hiệu singlet ở 6,93 ppm có cường độ ứng với 2 proton. Như vậy, trên phổ  $^1H$ -NMR khác với FAD7, FAD8 mất đi 2 proton ở C-2' và C-6'.

Proton của C-6 và C-8 đều xuất hiện 1 pic đôi (doublet) nằm ở  $\delta$  6,19 ppm và 6,44 ppm. Hằng số tương tác hoá học  $J_{H-6, H-8} = 2,6$  Hz.

Các tín hiệu của H-3' và H-5' nằm ở 6,93 ppm và là 1 pic đơn, chứng tỏ H-3' và H-5' tương đương.

-  $^{13}C$ -NMR: Phổ  $^{13}C$ -NMR của FAD8 cho 13 tín hiệu của 15 nguyên tử carbon (C-3' trùng C-5'; C-2' trùng C-6') ở vùng lớn hơn 80 ppm. Độ dịch chuyển của các nguyên tử carbon thể hiện cấu trúc đặc trưng của khung flavonol.

Kết quả phân tích phổ  $^1H$ -NMR và  $^{13}C$ -NMR của FAD8 được trình bày ở bảng 2.

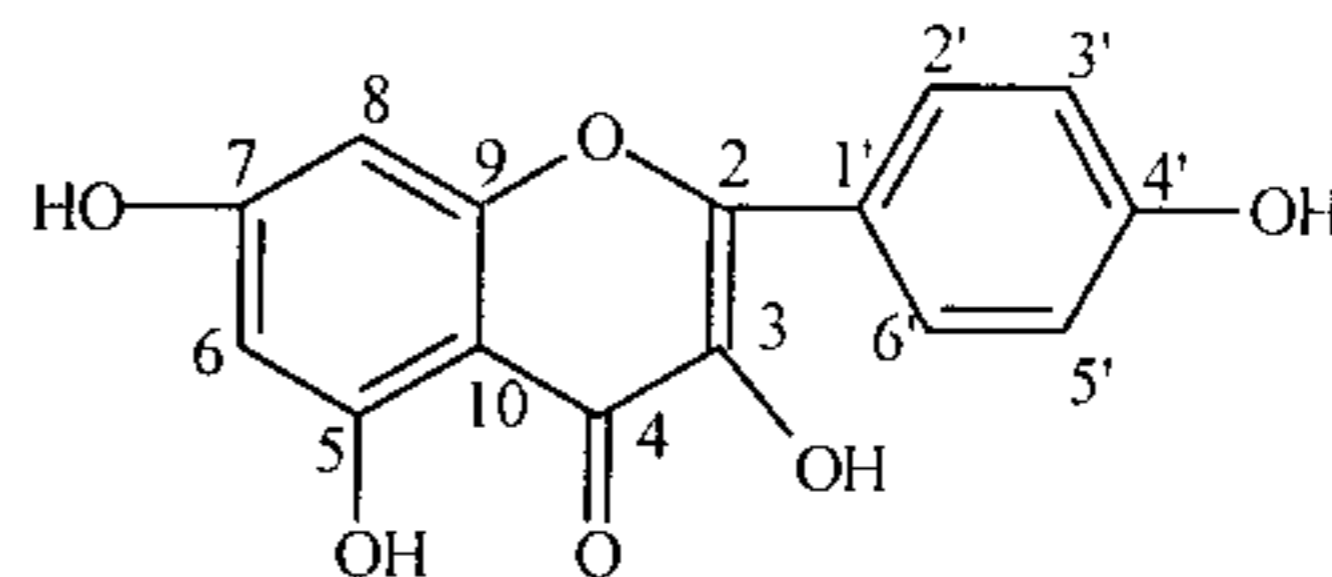
Bảng 2. Số liệu phổ  $^1H$ -NMR và  $^{13}C$ -NMR của FAD8 (DMSO-D<sub>6</sub>,  $\delta$  (ppm), 500 MHz)

| Vị trí carbon | $\delta_H$ (ppm) FAD8 | $\delta_C$ (ppm) FAD8 |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| 2             |                       | 156.4                 |
| 3             |                       | 135.8                 |
| 4             |                       | 176.1                 |
| 5             | 12.48 (OH, s)         | 160.9                 |
| 6             | 6.19 (d)              | 98.4                  |
| 7             |                       | 164.1                 |
| 8             | 6.44 (d)              | 93.7                  |
| 9             |                       | 159.4                 |
| 10            |                       | 103.2                 |
| 1'            |                       | 121.9                 |
| 2'            |                       | 129.7                 |
| 3'            | 6.93 (s)              | 115.6                 |
| 4'            |                       | 147                   |
| 5'            | 6.93(s)               | 115.6                 |
| 6'            |                       | 129.7                 |

Từ các kết quả phân tích số liệu phổ: UV, IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  có so sánh với dữ liệu phổ chuẩn [4],[5], chúng tôi kết luận FAD8 là một flavonol, có công thức hoá học là  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ , công thức cấu tạo là 3, 5, 7, 4'-tetra-hydroxy flavon, có tên là kaempferol.

### Kết luận

Kaempferol và kaempferol 7-O-glycozid cùng với acid gallic và acid ellagic [2] [3] được phân lập lần đầu tiên từ đơn lá đỏ có ý nghĩa trong việc tiêu chuẩn hoá và kiểm nghiệm dược liệu làm thuốc,



Hình 2. Cấu trúc của FAD8: kaempferol

bên cạnh việc làm sáng tỏ kinh nghiệm dân gian sử dụng vị thuốc này.

### Tài liệu tham khảo

- 1). Nguyễn Thái An, Phạm Xuân Sinh (1999). *Tạp chí Dược học*, 1, 9-10; 2). Nguyễn Thái An; Phạm Xuân Sinh (2002). *Tạp chí Dược liệu*, số 2, tập 7, 35-37; 3). An Nguyen Thai et al. (2001). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Excoecaria cochinchinensis* Lour. *Euphorbiaceae*, Proceedings of Pharma Indochina II, 229 – 231; 4). Markham K.R., Geiger H., Mabry T.J. (1978). *Tetrahedron*, Vol. 34, 1389-1397; 5). *The Sadler-Guide to NMR Spectrum* (1992). Sadler Research Laboratories, Inc., Philadelphia, USA; 6). J.B. Harborne (1973). *Phytochemical method*. Chapman and Hall; 7). J.B. Harborne (1975). *The Flavonoid*, Academic Press, London; 8). *Method in Plant Biochemistry* (1993). Academic Press.

*Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 107-110)*

## ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF CONSTITUENTS FROM *MILIUSA BALANSAE*

Do Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Christine Kamperdick<sup>1</sup>, Nguyen Hong Van<sup>1</sup>, Tran Van Sung<sup>1</sup>  
Nguyen Hai Nam<sup>2</sup>, Ahn Byung Zun.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>.Institute of Chemistry, NCNST, Hanoi, Vietnam;

<sup>2</sup>. College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon, Korea

(Received May 5, 2003)

### Summary

*One of the new styrylpyrans isolated from Miliusa balansae, 3,4-dimethoxy-6-styrylpyran-2-one, has moderate in vitro antiangiogenic activity in angiogenesis assay using HUVEC model.*

*Key words: Miliusa balansae, 3,4-Dimethoxy-6-styrylpyran-2-one, Antiangiogenic, HUVEC, B16F10 melanoma cells.*

### Introduction

*Miliusa balansae* Fin. & Gagn, a shrub growing in some provinces of Vietnam [1], has been used as a traditional herbal medicine for the treatment of gastropathy and glomerulonephro-pathy [2] but no publications related to its antiangiogenic activity are available.

In the screening of Vietnamese medicinal plants for antiangiogenic activity, we have found

that the MeOH extract of *Miliusa balansae* exhibited a significant inhibitory effect on the formation of the microtubular network induced by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We have also isolated and structurally elucidated a new styryl derivative (1) and six known compounds (2-7) [3] (Figure 1). This paper presents the results of the study on antiangiogenic activity of these compounds.

## Materials and Methods

### Reagents and instruments

RPMI 1640 medium, Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), medium 199 (M-199), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, dimethylsulfoxide (DMSO), sulforhodamine B (SRB), phosphate buffer saline (PBS), trypsin-EDTA solution (100mL), tris (hydromethyl) aminomethane (tris-base), albumin and other reagents used for cell cultures and assays were purchased from GIBCO. Co., Ltd. (Grand Island, NY). Optical density was read on an ELISA reader (Spectrals Max 250, USA). Photo of the *in vitro* antiangiogenic assay was taken with a camera incorporated in a phase contrast microscope (Olympus) and the total length was measured using an Adobe Photoshop TM software. Cells were cultured in an incubator purchased from Shellb Co. Ltd.

### Preparation of samples for assays

The compounds were dried and then dissolved in DMSO at the initial concentration of 100 mg/ml and serially diluted into concentrations of 30, 10, 3 and 1 mg/ml.

### Cells and cultures

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) purchased from Sanko Junyaku Co.

Ltd., Tokyo, Japan, were grown in M-199 supplemented with L-glutamine (0.2 mM), penicillin/streptomycin (50 units/ml), amphotericin (5 units/ml), heparin (5 units/ml), 200 µg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS, Collaborative Research, Inc., Bedford, MA) and 20% bovine calf serum (BCS, Hyclone, Logan, UT, Lot # 21511098) in 150 mm tissue culture dishes (Nunc, Intermed, Denmark). All cells were preserved frozen between passages 3 and 4. Biological experiments were carried out with cells between passages 5-14. B16F10 murine melanoma cells were obtained from a cancer cell bank at Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and L-glutamine (0.2 mM).

### *In vitro* cytotoxicity assay

Cells at logarithmic phase were trypsinized, dispersed into a single-cell suspension in RPMI supplemented with 5% FBS and adjusted to a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/ml of which, 180 µl were dispensed into each well of a 96-well plate. The plate was then incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. After 24-h incubation, test samples at various concentrations prepared in 20 µl of RPMI supplemented with 5% FBS were added and the plate was further incubated for 48 h. All samples were prepared in

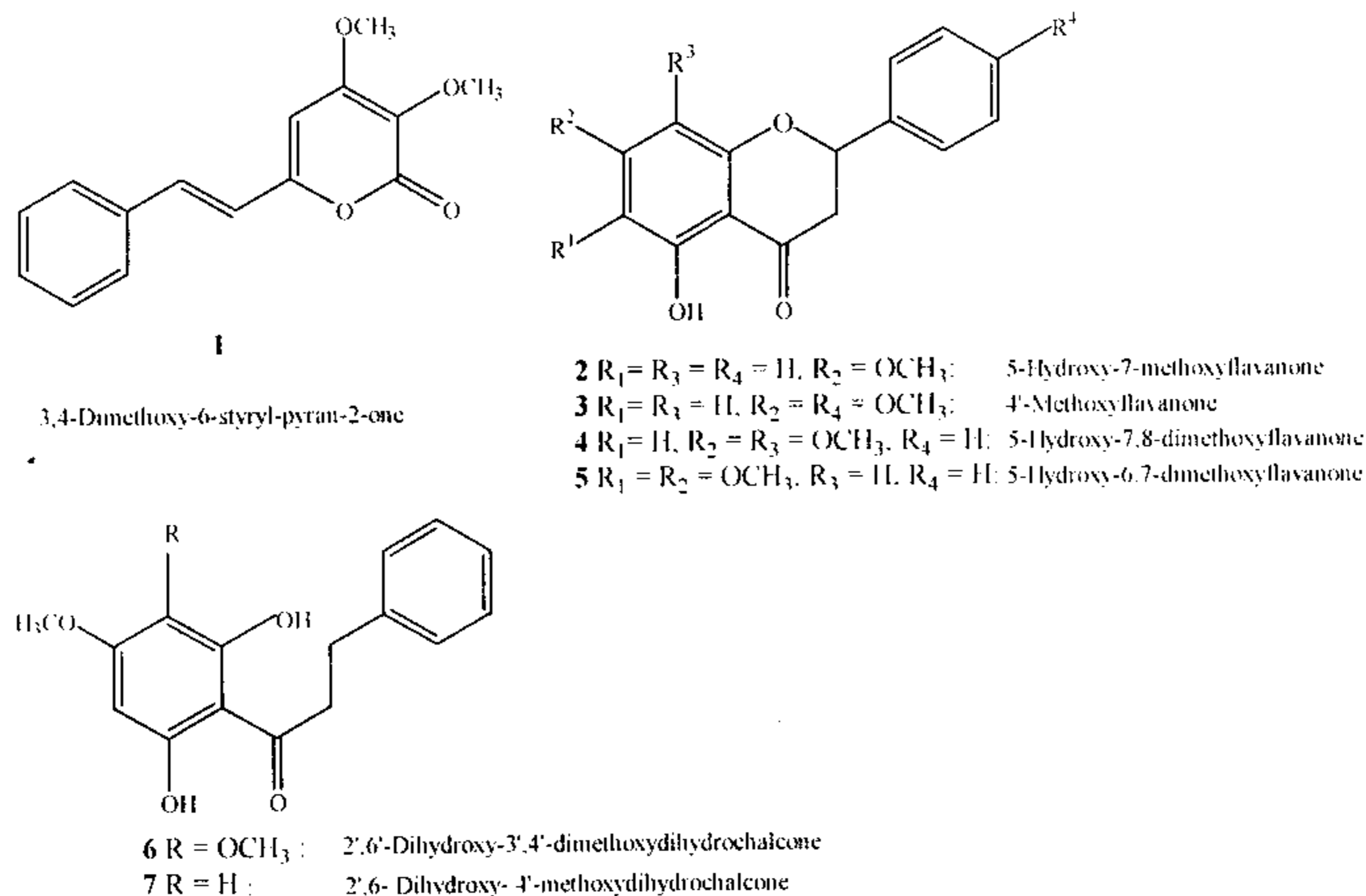


Figure 1. The isolated compounds from *Miliusa balansae*.

such a way that the final concentration of DMSO was less than 0.1 %. Cytotoxicity was measured by SRB's method [4] and values were calculated using Probit's method [5]. In brief, cells were fixed by gently layering 50  $\mu$ l of cold 50 % trichloroacetic acid on the top of the growth medium in each well and incubated at 4 °C for 1h and then washed five times with tap water. The wells were air-dried and stained with 0.4 % sulforhodamine B (w/v) in 1% acetic acid for 30 min., rinsed four times with 1% acetic acid to remove unbound dye and redried at room temperature and the bound dye was dissociated with 100  $\mu$ l of 10 mM unbuffered tri-base (pH 10.5). Adsorbance was read with an ELISA reader at 540 nm. The IC<sub>50</sub> value was the concentration of a sample that reduces adsorbance by 50% in comparison with the control (vehicle-treated well). Results were averages of four independent measurements in which adsorbance readings were varied less than 5%.

#### *In vitro* angiogenesis assay

Aliquots of 200  $\mu$ l matrigel (Biomedical Research Products, Bedford, MA), thawed on ice to prevent premature polymerization, were plated into individual wells of 24-well tissue culture plates (Costar, Amherst, MA) and allowed to polymerize at 37 °C for at least 30 min. Cells were removed from confluent culture by treatment with trypsin-EDTA. The cells were washed with serum-containing medium, then resuspended to 1.6 x 10<sup>5</sup> cells/ml in complete HUVEC culture medium. Into each culture well, 500  $\mu$ l of medium-199 was added with or without additional test substances. Finally, 500  $\mu$ l of cell suspension was added, making the final culture of 8 x 10<sup>4</sup> cells in 50% complete HUVEC culture medium at a volume of 1 ml. After incubation for 16-18 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, four different phase-contrast microscopic fields (x 100) per well were photographed and the micrographic pictures were put on a computer. The total length of the tubular structures in each photograph was measured using Adobe Photoshop TM software. The total capillary length per well was given as the average value of the data from four fields. The

inhibition percentage was calculated following an equation:

$$\text{Inhibition percentage} = \frac{LC - LS}{LC} \times 100$$

Where LC is the average total length of three control (vehicle-treated) wells and LS is the average total length of three sample wells.

#### Results

Cytotoxicity and antiangiogenic activity of the compounds 1  $\rightarrow$  7 evaluated *in vitro* against B16F10 murine melanoma were shown in table 1.

**Table 1.** Cytotoxicity and antiangiogenic activity of the isolated compounds

| Compound | Cytotoxicity/B16 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) | Antiangiogenic activity* (at 10 $\mu$ g/ml) |
|----------|---|---|
| 1        | 13.49   | ++  |
| 2        | > 10  | -   |
| 3        | > 10  | -   |
| 4        | > 10  | -   |
| 5        | > 10  | -   |
| 6        | > 10  | -   |
| 7        | > 10  | -   |

\*Activity is denoted as follows: (-): no activity; (+): weak activity (inhibition >30%); (++): moderate activity (30% <inhibition < 60%).

As seen from table 1, most compounds including flavanones, chalcones, styryl derivatives have no cytotoxicity and no antiangiogenic activity, except for the new compound 1 (3,4-dimethoxy-6-styrylpyran-2-one). This compound has moderate anti-angiogenic activity at 10 $\mu$ g/ml with low cytotoxicity. The novel structural feature of this molecule and its selective angiogenesis inhibitory effect warrant further medicinal chemistry investigation to obtain more potent analogues. Research in this direction is currently being conducted in our laboratories.

*Acknowledgements:* This investigation was supported in part by Korea Science and Engineering Foundation.

#### References

- 1). Nguyen Tien Ban, Flora of Viet Nam- Annonaceae Juss. Science & Technics Publishing House, Hanoi, 308-309, 2000; 2). Wu, Rui; Ye, Qi; Chen, Neng Yu; Zang, Guo Lin. *Chem. Lett. Chin.*, 12(3), 247-248, 2001; 3). Christine Kamperdick, C; Van, N.H; Sung, T.V. *Phytochemistry*, 61, 991-994, 2002; 4). Skelhan, P..Storeng, R..

Scudiero, D., Monk, A., MacMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenny, S., Boyd, M.R. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112, 1990; 5). Wu, L., Smythe, A. M., Stinson, S. F., Mullendore, L.A., Monks, A., Scudiero, D. A., Paull, K. D., Koutsoukos, A.D., Rubinstein, L. V., Boyd, M.R., Shoemaker, R.H *Cancer Res.* 52, 3029-3034, 1992.

*Tap chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 110-114)*

## TÁC DỤNG CỦA DỊCH CHIẾT LÁ CHÈ XANH LÊN VI KHUẨN SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao  
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN & CNQG  
(Nhận bài ngày 7 tháng 5 năm 2003)

### Summary

#### Effects of *Camellia sinensis* Leaf Extract on Dental Caries Causing *Streptococcus mutans*

*Green tea (Camellia sinensis L.) leaves contain as high as 26% polyphenols on dry basis. Their ethanol extract (CX) showed inhibition of glycolysis, biofilm formation and respiration of the dental caries causing Streptococcus mutans. At concentration of 0.05%, CX suppressed about 30% oxygen consumption in glucose excessive medium and totally inhibited NADH oxidase activity of the bacteria. At concentration of 0.05%, the extract also killed the bacteria with D value of about 13 min. Combination of 0.025% CX and 0.25mM NaF blocked pH drop during glycolysis while combination of 0.05% CX with 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.002% FeSO<sub>4</sub> did not augment killing of the bacteria. The results suggest that polyphenols from green tea leaves can inhibit the adherence of S. mutans in vitro, and may be useful for controlling dental caries.*

*Key words: Camellia sinensis L., Polyphenols, Streptococcus mutans, Dental Caries.*

### I. Mở đầu

Cho đến nay, fluor vẫn là một tác nhân chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng miệng. Tuy nhiên, tình trạng nhiễm fluor (fluorosis) [14] đã dẫn đến việc cần thiết phải tìm kiếm những hợp chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluor ở nồng độ thấp nhưng vẫn hiệu quả trong việc chống sâu răng. Theo hướng này, một loạt những hợp chất có tác dụng diệt khuẩn như các acid yếu, clorohexidin, triclosan, paraben... đã được nghiên cứu. Ngoài ra, một số hợp chất tự nhiên được chiết xuất từ thực vật như sanguinarin, tanin, eucalyptol... cũng đã được khảo sát và có khả năng chống sâu răng [9].

Trong các dịch chiết thực vật, nhóm hợp chất polyphenol được đặc biệt quan tâm. Các hợp chất này, điển hình là các flavonoid, có tác dụng như những tác nhân kháng khuẩn, chống oxi hoá, một số khác có tác dụng ức chế quá trình phân bào của các dòng tế bào ung thư [11]. Gần đây, một số tác giả đã nghiên cứu tác dụng chống sâu răng của polyphenol trong chè xanh (*Camellia sinensis* L.)

[7,10], nhưng cơ chế tác dụng của chúng vẫn chưa được nghiên cứu sâu. Việt Nam có một số bài thuốc chữa sâu răng bằng dịch chiết thực vật được lưu truyền trong dân gian. Tuy vậy, hiệu quả cũng như cơ chế tác dụng của chúng vẫn chưa được đánh giá đầy đủ.

Để góp phần làm sáng tỏ cơ chế chống sâu răng của chè xanh, chúng tôi đã khảo sát một cách toàn diện ảnh hưởng của dịch chiết này đối với vi khuẩn *Streptococcus mutans*, một trong những chủng chủ yếu gây sâu răng ở người.

### II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 1. Chủng vi sinh vật

Chủng *Streptococcus mutans* GS-5, lấy từ phòng thí nghiệm của GS. Robert E. Marquis, Đại học Tổng hợp Rochester, New York, Hoa Kỳ, được giữ và cấy chuyển hàng tuần lên môi trường thạch (tryptic soy agar -TSA) của hãng Difco.

#### 2. Nguyên liệu thực vật

Lá chè xanh tươi và khô được chiết trong các dung môi khác nhau là nước, ethanol, cloroform và

ethyl acetat bằng phương pháp ngâm kiệt và Soxhlet.

### 3. Phương pháp nghiên cứu

a. Định tính và định lượng polyphenol toàn phần: Polyphenol được định tính bằng  $\text{FeCl}_3$  5% và NaOH 10% và định lượng theo phương pháp Folin-Dennis lấy acid gallic làm chất chuẩn [6].

b. Xác định pH trong quá trình đường phân: Các thí nghiệm đo sự giảm pH trong quá trình đường phân được tiến hành như Belli & cs mô tả [1] trên máy đo pH MP225 Mettler Toledo.

c. Hô hấp của tế bào: Cường độ hô hấp của tế bào được đo theo phương pháp của Caldwell & cs [2]. Dung dịch tế bào bão hoà không khí được dùng ngay để đo lượng  $\text{O}_2$  tiêu thụ ở nhiệt độ phòng trên máy đo  $\text{O}_2$ , WTW OXI 330, Đức.

d. Tác dụng gây chết: Các thí nghiệm về tác dụng gây chết được tiến hành như Phan & cs mô tả [12]. Kết quả được biểu thị bằng giá trị D (là thời gian mà 90% tế bào vi khuẩn bị chết dưới tác dụng của tác nhân cần khảo sát). Ngoài ra, còn được tính bằng giá trị  $\text{LogN}/\text{No}$ , trong đó N là số tế bào sống sót ở thời điểm thu mẫu và  $\text{No}$  là số tế bào ban đầu. Như vậy, D chính là thời điểm có  $\text{LogN}/\text{No} = -1$ .

e. Hoạt tính enzym: Dịch chiết tế bào được chuẩn bị theo phương pháp của Phan & cs [12]. Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [13]. Một đơn vị hoạt tính NADH oxidase là lượng enzym xúc tác để oxi hoá 10 mol NADH trong 1 phút ở điều kiện phản ứng.

f. Tạo biofilm: Biofilm của *S. mutans* hình thành trên lam kính thuỷ tinh được tiến hành như Curran & cs [4] đã mô tả.

### III. Kết quả

#### 1. Ảnh hưởng của phương pháp và dung môi chiết đến hàm lượng và hoạt tính của polyphenol

Polyphenol trong chè xanh có vai trò chủ yếu trong việc chống sâu răng [8]. Phương pháp chiết và dung môi chiết có ảnh hưởng khá lớn đến hoạt tính của các chất này, vì vậy, chúng tôi đã dùng phương pháp ngâm kiệt và Soxhlet với các dung môi khác nhau để so sánh. Phản ứng định tính đặc trưng của polyphenol được thử với  $\text{FeCl}_3$  5% và NaOH 10%. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy phương pháp Soxhlet cho hàm lượng polyphenol cao hơn phương pháp ngâm kiệt. Xét riêng phương pháp ngâm kiệt, nước và ethanol là những dung môi tốt nhất.

**Bảng 1.** Hàm lượng polyphenol trong lá CX chiết bằng các phương pháp và dung môi khác nhau

| Phương pháp chiết | Dung môi              | Phản ứng với $\text{FeCl}_3$ 5% | Phản ứng với NaOH 10% | Polyphenol toàn phần (%) | Hoạt tính ức chế giảm pH |
|-------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Soxhlet           | Ethanol               | Đen                             | Nâu                   | 26.04                    | ++                       |
|                   | Nước                  | Đen                             | Nâu                   | 27.78                    | +                        |
|                   | Cloroform → Ethanol   | Đen                             | Nâu                   | 12.09                    | +                        |
|                   | Ethanol → Ethylacetat | Đen                             | Nâu                   | 7.9                      | +                        |
| Ngâm kiệt         | Ethanol               | Đen                             | Nâu                   | 15.9                     | +++                      |

Nhưng xét về hoạt tính thì phương pháp chiết ngâm kiệt, đặc biệt là với dung môi ethanol, lại có hoạt tính ức chế sự đường phân (thể hiện ở ức chế giảm pH) của vi khuẩn *S. mutans* cao hơn. Khả năng ức chế sự giảm pH của dịch chiết thực vật đối với vi khuẩn *S. mutans* trong môi trường dư thừa glucose thường được sử dụng để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết. Tuy phương pháp Soxhlet cho hàm lượng polyphenol cao hơn nhưng hoạt tính yếu hơn phương pháp ngâm kiệt do polyphenol đã bị phân huỷ hoặc polyme hoá dưới

tác dụng của nhiệt trong quá trình chiết.

Dựa trên các kết quả này, chúng tôi đã sử dụng dịch chiết ngâm kiệt của CX trong ethanol cho các thí nghiệm tiếp theo.

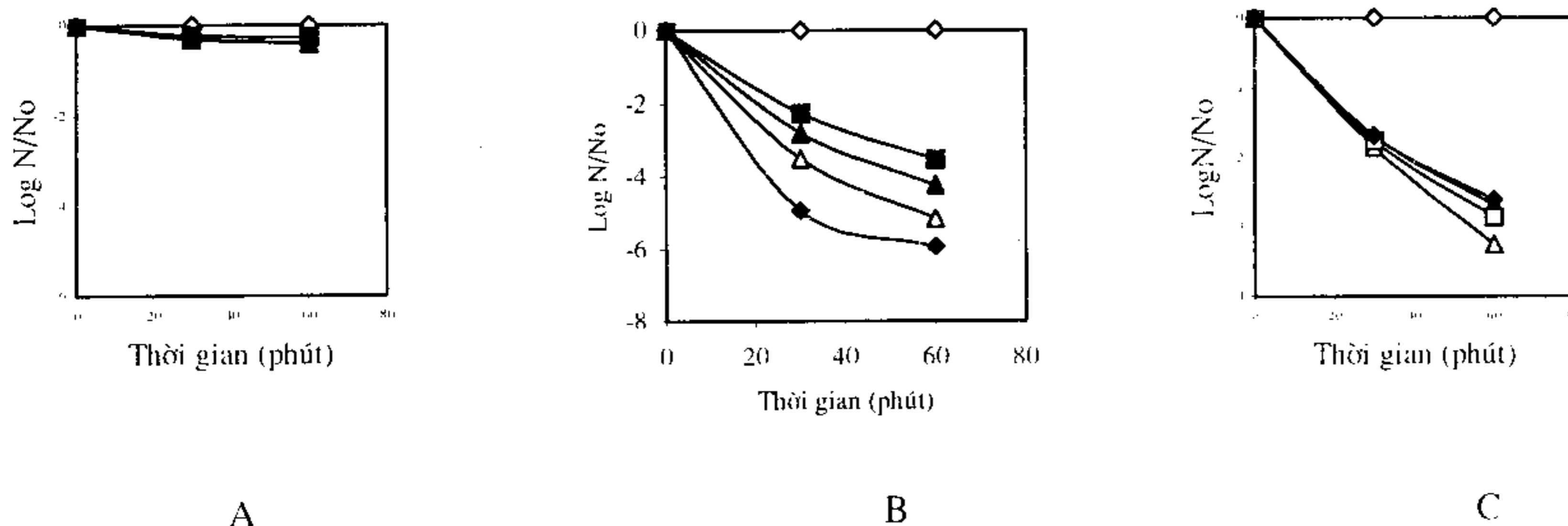
#### 2. Tác dụng tăng cường ức chế sự đường phân của CX kết hợp với fluor

Thí nghiệm này nhằm mục đích kiểm tra khả năng tăng cường ức chế sự giảm pH trong dịch tế bào *S. mutans* của CX khi kết hợp với NaF 0,25

mM, nồng độ thấp hơn khoảng 100 lần so với nồng độ hiện đang được sử dụng trong thuốc đánh răng và cũng là nồng độ fluor được tìm thấy trong mảng bám răng. Tốc độ giảm pH phản ánh khả năng sản xuất acid của tế bào, giá trị pH cuối cùng của dịch tế bào phản ánh khả năng chống chịu acid. Đối với những chủng có khả năng chống chịu acid như *S. mutans*, giá trị pH cuối cùng thường là dưới 4,0. Kết quả đáng chú ý là công thức kết hợp CX 0,025% + NaF 0,25mM đã có tác dụng tăng cường ức chế sự giảm pH trong quá trình đường phân (hình 1). Kết quả này sẽ là những gợi ý có ý nghĩa cho việc cải thiện các sản phẩm vệ sinh răng miệng.

### 3. Tác dụng gây chết vi khuẩn của CX

Trong thí nghiệm này, tế bào được tiếp xúc trực tiếp với dịch chiết ở những nồng độ khác nhau. Hình 2 cho thấy dịch chiết có tác dụng gây chết vi khuẩn *S. mutans* và khả năng diệt khuẩn tăng dần



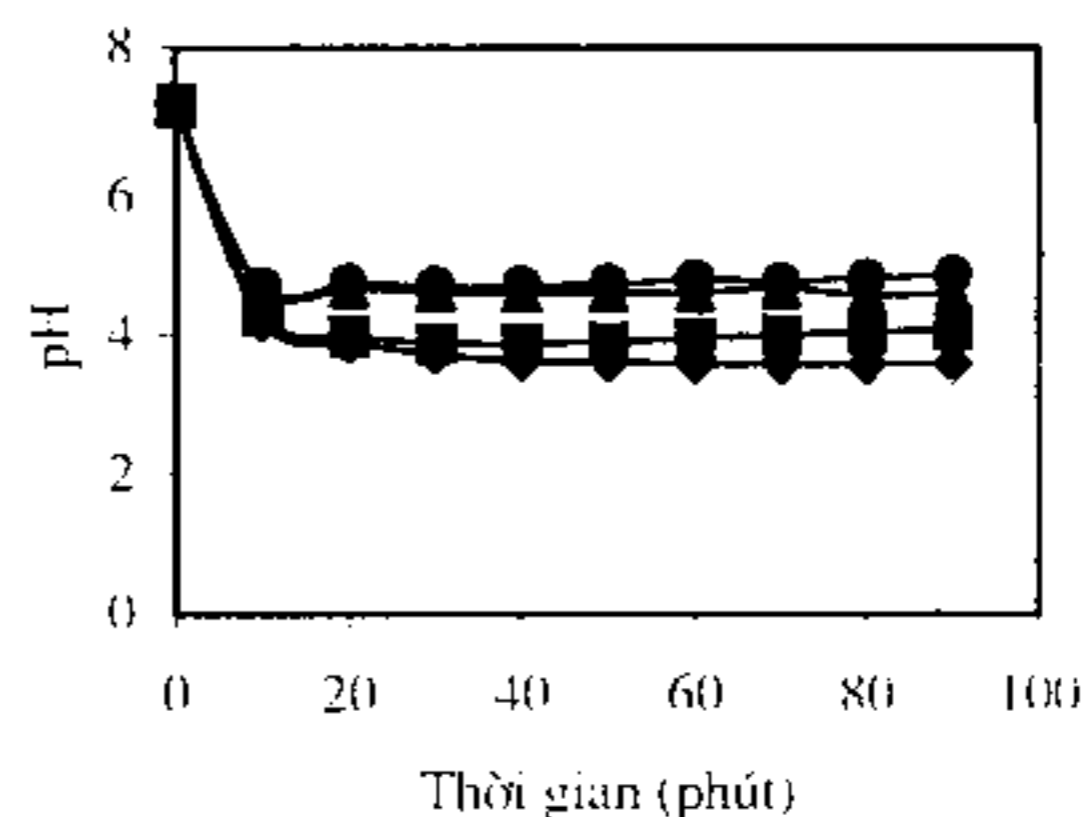
Hình 2. Tác dụng gây chết vi khuẩn của CX

A. Đối chứng (◇), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.02% (■), FeSO<sub>4</sub> 0.002% (▲); B. Đối chứng (◇), CX 0.005% (■), CX 0.01% (▲), CX 0.025% (△), CX 0.05% (◆); C. Đối chứng (◇), CX 0.005% (△), CX 0.005%+Fe (▲), CX 0.005%+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (□), CX 0.005% + FeSO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (◆).

### 4. Ảnh hưởng của dịch chiết CX lên sự hình thành biofilm của *S. mutans*

Biofilm một lớp của *S. mutans* đều hình thành sau 6 ngày ở cả mẫu đối chứng và mẫu có 0,05% CX (ảnh 1). Tuy nhiên, ở mẫu CX sự hình thành biofilm bị ức chế một phần so với đối chứng (hình 3). Kết quả này gợi ý về vai trò ứng dụng của dịch chiết CX trong việc làm giảm sự hình thành mảng bám răng.

### 5. Ảnh hưởng của CX lên hô hấp của *S. mutans*



Hình 1. Tác dụng tăng cường ức chế đường phân của CX kết hợp với fluor. Đối chứng (◇), CX 0,025% (■), NaF 0,25mM (□), CX+NaF (●)

khi nồng độ các chất nghiên cứu tăng. Giá trị D đạt khoảng 13 phút đối với dịch chiết CX 0,05%. Kết hợp dịch chiết với các ion có khả năng chuyển đổi như Fe<sup>2+</sup> và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> không làm tăng khả năng diệt khuẩn (hình 2A, 2B, 2C).

Trong môi trường dư thừa glucose, ở pH 7,0, CX đã ức chế quá trình tiêu thụ oxy của tế bào *S. mutans*. Ở nồng độ 0.025%, CX ức chế đến 30% sự tiêu thụ oxy của tế bào (hình 4). Có lẽ các dịch chiết này đã ức chế NADH oxidase - là enzym đóng vai trò quan trọng trong quá trình hô hấp của tế bào.

### 6. Ảnh hưởng của CX lên hoạt tính enzym NADH oxidase của vi khuẩn *S. mutans*

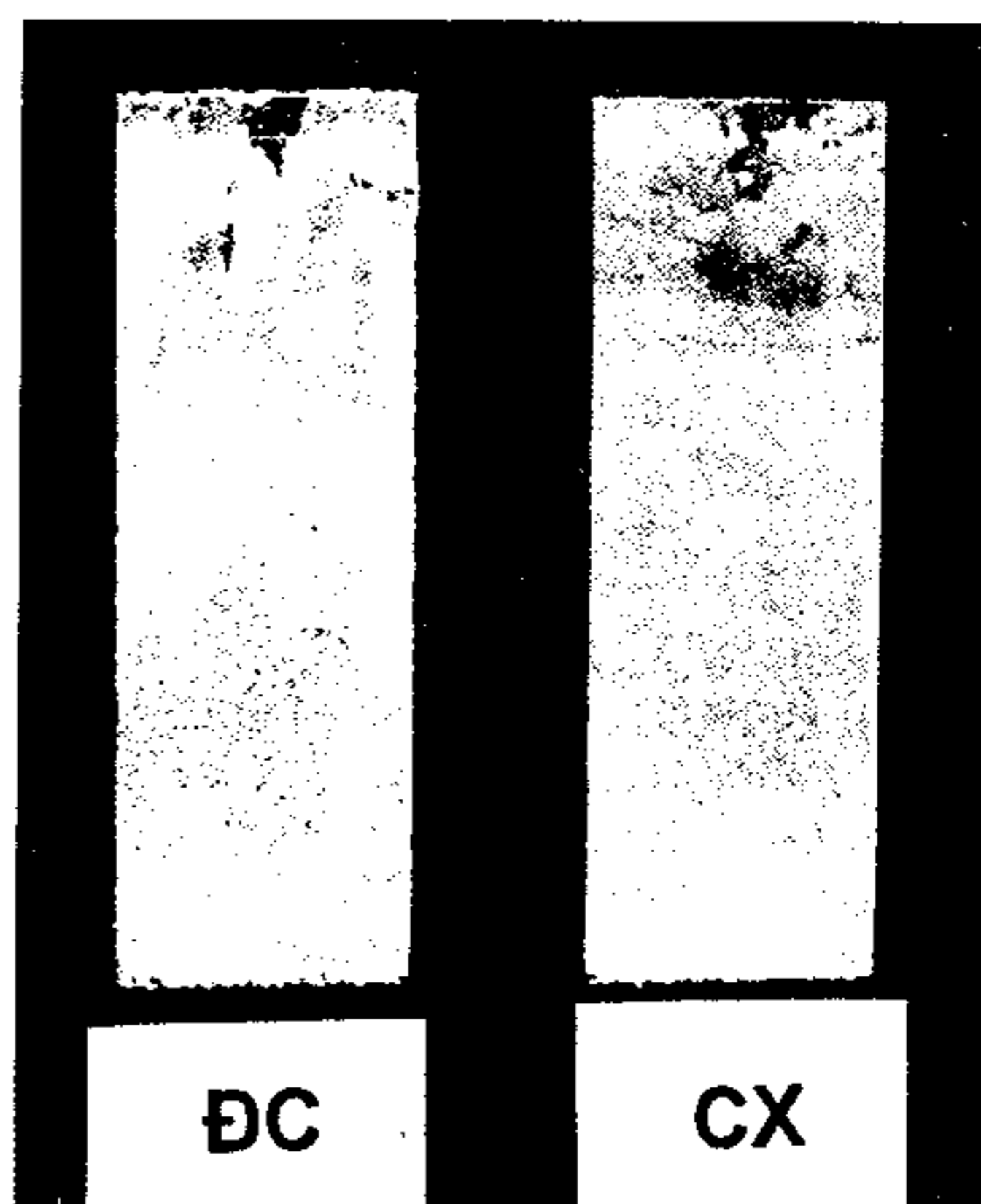
Để kiểm tra ảnh hưởng của dịch chiết CX đến



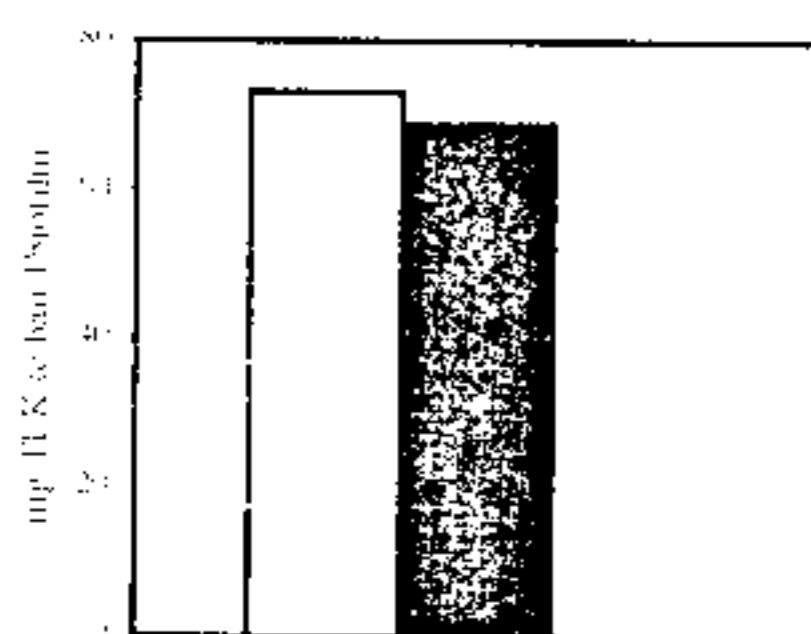
NADH oxidase, chúng tôi đã đo hoạt tính enzym này của *S. mutans* ở các nồng độ dịch chiết khác nhau. Kết quả ở hình 5 cho thấy ở nồng độ 0.05%, dịch chiết CX ức chế hoàn toàn hoạt tính của NADH oxidase. Kết quả này giải thích tại sao dịch chiết CX lại ức chế sự hô hấp của *S. mutans*.

#### IV. Thảo luận

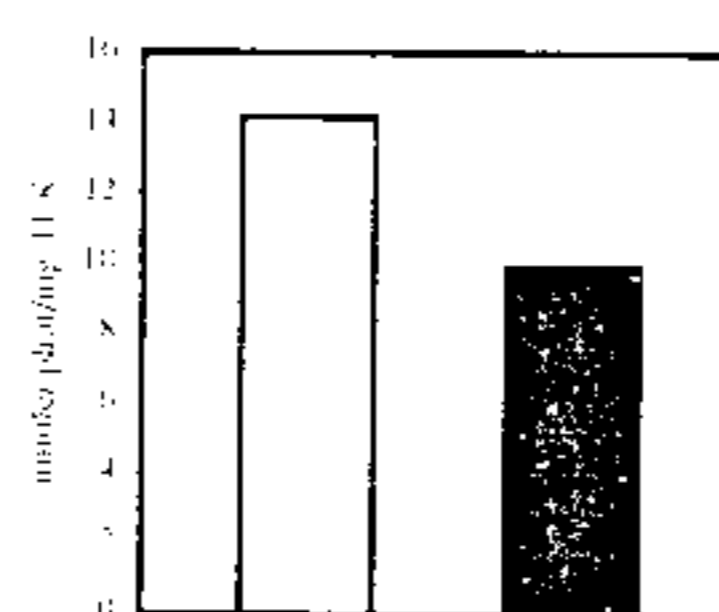
Các nghiên cứu trên đây cho thấy dịch chiết CX có tác dụng ức chế một số quá trình sinh lý, sinh hoá như quá trình đường phân hoá và sinh acid của *S. mutans*. Có lẽ các chất có trong dịch chiết đã đi qua được màng tế bào như một số acid yếu khác [1] và tác động đến một số enzym tham gia vào quá trình đường phân. Các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào việc kiểm tra ảnh hưởng của CX lên một số enzym tham gia vào quá trình này như lactat dehydro genase, enolase, glyceraldehyd dehydrogenase và đặc biệt là những enzym có vai trò quan trọng trong quá trình vận chuyển đường nằm trên màng tế bào như PTS và ATPse để kháng



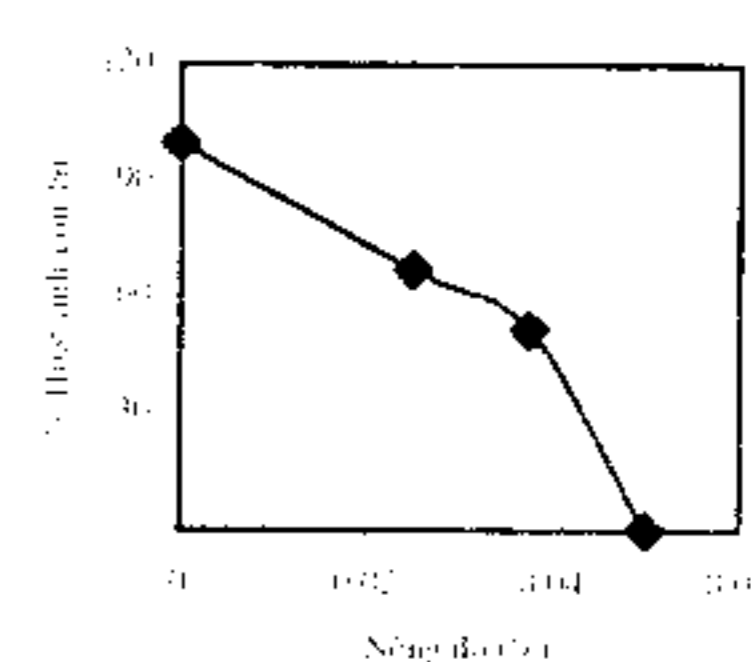
Ảnh 1. Sự hình thành biofilm của *S. mutans* trong sự có mặt của dịch chiết CX



Hình 3. Ảnh hưởng của CX lên sự phát triển của vi khuẩn *S. mutans* trên biofilm. Đối chứng (□), CX 0.025% (■)



Hình 4. Ảnh hưởng của CX lên hô hấp của vi khuẩn *S. mutans*. Đối chứng (□), CX 0.025% (■)



Hình 5. Ảnh hưởng của CX lên hoạt tính enzym NADH oxidase của vi khuẩn *S. mutans*.

định giả thiết này. Tác dụng ức chế một phần sự tạo biofilm gợi ý dịch chiết có thể đã ức chế hoạt tính của enzym glucosyltransferase, là enzym có vai trò quan trọng trong việc hình thành các polyme ngoại bào, điều kiện quan trọng để tạo thành biofilm của vi khuẩn [3]. Như vậy, ảnh hưởng của dịch chiết CX lên enzym này cần được kiểm tra để chứng minh vai trò của nó trong việc ức chế sự hình thành mảng bám răng. CX có tác dụng gây chết khá mạnh đối với *S. mutans*, nhưng khi kết hợp với các ion có khả năng chuyển đổi như  $Fe_2^+$  và  $H_2O_2$  với mục đích tăng tác dụng diệt khuẩn lại cho kết quả âm tính. Điều này có thể giải thích một phần là do dịch chiết CX chứa một hàm lượng rất lớn tanin, khoảng 30% [8]. Ngoài tác dụng kháng khuẩn, tanin còn có thể liên kết với rất

nhiều hợp chất khác, kể cả các nguyên tố vi lượng. Ở đây, có thể tanin đã kết hợp với  $Fe_2^+$  và  $H_2O_2$  làm biến đổi tính chất và làm giảm tác dụng sinh học của dịch chiết. Dịch chiết CX kết hợp với fluor ở nồng độ thấp đã ức chế sự sinh acid của vi khuẩn. Điều này có ý nghĩa ứng dụng cao để cải thiện các sản phẩm vệ sinh răng miệng.

Ở những chủng vi khuẩn gây bệnh đường miệng như *S. mutans* hay *S. sobrinus*, khả năng hô hấp liên quan chủ yếu đến hai hệ thống enzym NADH oxidase sinh  $H_2O_2$  (Nox-1) và sinh  $H_2O$  (Nox-2) [5]. Các số liệu thu được về khả năng ức chế NADH oxidase trên đây gợi ý CX ức chế khá mạnh cả Nox-1 và Nox-2. Điều này cũng giải thích vì sao dịch chiết CX lại có tác dụng ức chế quá

trình hô hấp của vi khuẩn. Tóm lại, cơ chế kháng khuẩn của CX đối với *S. mutans* có thể do ức chế quá trình đường phân, hoạt tính NADH oxidase và hô hấp, hạn chế sự hình thành mảng bám răng và gây chết. Các nghiên cứu sâu hơn về tác động của dịch chiết này lên các enzym khác đang được tiến hành để khẳng định vai trò chống sâu răng của chè xanh.

## V. Kết luận

Polyphenol trong lá chè xanh có tác dụng ức chế một số quá trình sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn *S. mutans* trên mảng bám răng. Tuy vậy, cơ chế tác động của chúng là phức tạp và cần được tiếp tục nghiên cứu.

## Tài liệu tham khảo

- 1). Belli, W.A., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1995. *Can. J. Microbiol.* 41:785-791; 2). Cardwell, C.E., Marquis, R.E. 1999. *Oral. Microbiol. Immunol.* 14: 66-72; 3). Cox, S.D., Lassiter, M.O., Taylor, K.G. and Doyle, R.J. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:331-334; 4). Curran, T.M., Buckley, D.H. and Marquis, R.E. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 283-288; 5). Gibson, C.M., Mallett, T.C., Caliborne, A., Caparon, M.G. 2000. *J. Bacteriol.* 182:448-455; 6). Gressman A. 1975. *The chemistry of phenolic compounds.* Acad. Press, London; 7). Hamilton-Miller, J.M.T. 2001. *J. Med. Microbiol.* 50: 299-302; 8). Đỗ Tất Lợi. 1986. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam.* Nhà xuất bản Khoa học Kỹ Thuật; 9). Limsong, J., Benzavongkulchai, E. 2001. *J. Dent. Res.* 80:724; 10). Makimura, M., Hirasawa, M, Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S. Taguchi, T., and Otake, S. 1993. *J. Periodontol.* 74: 630-636; 11). Middleton, E.Jr., Kadaswami, C. and Theoharides, T.C. 2000. *Pharmacol. Rev.* 52(4): 673-751; 12). Phan, T.N., Nguyen, P.T.M., Abranches, J. and Marquis, R.E. 2002. *Oral. Microbiol. Immunol.* 17: 119-124; 13). Pool LB, Claiborne (1986). *J. Biol. Chem.* 261:14525-14533; 14). Richards, A.J. 1993. *Health effects of ingested fluoride.* National Academy Press Washington D.C. USA, pp. 22-49.

*Tap chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 114-118)*

## NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG STRESS VÀ CHỐNG OXY HOÁ CỦA CÂY CHÂN CHIM LEO

*Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Lê Ngọc Thi, Hoàng Thị Mận, Trần Công Luận*

*Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp. HCM, Viện Dược liệu  
(Nhận bài ngày 14 tháng 3 năm 2003)*

### Summary

**Studies on Antistress and Antioxidant Effects of *Schefflera elliptica* (Blume) Harms. Araliaceae**

*Ethanol extracts of leaves and bark of *Schefflera elliptica* have antistress effect at the oral doses of 167 mg/kg and 158 mg/kg, respectively. Both extracts possess in vitro antioxidant activity at concentrations of 50-100 µg/ml. Saponins fractionated from bark are active in antioxidation at concentrations of 5-25 µg/ml. These findings suggest that the bark seems to induce stronger effect than the leaf and that saponins may be the active components in the antioxidant activity.*

*Key words: *Schefflera elliptica*, Bark, Leaf, Antistress Effect, Antioxidant Activity.*

### I. Đặt vấn đề

Việc nghiên cứu sàng lọc các cây thuốc họ Nhân sâm (Araliaceae) có tác dụng chống stress và tăng lực được thực hiện bởi Trung tâm Sâm & Dược liệu Tp. HCM cho thấy đa số các cây

thuộc chi *Schefflera* đã thể hiện các tác dụng này khá rõ [1]. *S. octophylla* hoặc *S. leucantha* đã được nghiên cứu nhiều về thành phần hoá học và tác dụng dược lý [2] trong khi đó, loài *S. elliptica* (Chân chim leo, chân chim

bầu dục) lại có rất ít thông tin. Đây là một loài được phân bố rộng rãi, dễ trồng và được sử dụng làm thuốc từ lâu theo kinh nghiệm dân gian. Do đó, bên cạnh những nghiên cứu về hóa thực vật, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu về tác dụng dược lý của *Schefflera elliptica* trên hai tác dụng chống stress và chống oxy hoá.

## II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 1. Nguyên liệu nghiên cứu:

Lá và vỏ thân *S. elliptica* (cây trồng ở Tp. HCM) được sấy khô, xay nhỏ và chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt qua 2 phân đoạn cồn 96° và cồn 45°. Cô cách thủy thành dạng cao toàn phần riêng biệt (cao lá và cao vỏ thân) đem sử dụng cho nghiên cứu tác dụng dược lý. Hàm lượng saponin toàn phần trong cao lá là 19,8% và trong cao vỏ thân là 8,2% (định lượng theo phương pháp Namba).

Saponin toàn phần được chiết từ vỏ thân *S. elliptica* được sử dụng để nghiên cứu tác dụng chống oxy hoá *in vitro*.

### 2. Súc vật thử nghiệm:

Chuột nhắt trắng đực (chủng ddY, trọng lượng trung bình 20 – 25 g) do Viện Pasteur TP.HCM cung cấp và để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

Thế tích cho uống hoặc tiêm phúc mô của các nguyên liệu nghiên cứu và thuốc thử nghiệm là 10ml/kg thể trọng chuột.

### 3. Phương pháp nghiên cứu:

#### 3.1. Thử nghiệm stress cô lập:

Stress cô lập được báo cáo là một trong những stress tâm lý tiêu biểu gây sự rút ngắn thời gian ngủ ở súc vật thử nghiệm (giảm 30% thời gian ngủ so với nhóm bình thường) [3].

Súc vật được chia làm 2 nhóm :

- Nhóm bình thường: nuôi theo nhóm 8-10 chuột.
- Nhóm stress: nuôi cô lập từng con trong thời gian 4 tuần.

Súc vật thử được uống nước hoặc nguyên liệu thử 1 giờ trước khi tiêm phúc mô pentobarbital natri (liều 50mg/kg). Thời gian ngủ của pentobarbital được ghi nhận từ lúc mất phản xạ thẳng bằng (righting reflex) đến khi hồi phục lại phản xạ này. Tác dụng chống stress được ghi nhận khi thuốc thử nghiệm phục hồi lại mức độ bình thường của giấc ngủ barbital bị rút ngắn bởi stress.

#### 3.2. Thử nghiệm chống oxy hoá *in vitro* [4, 5]

##### 3.2.1. Nguyên tắc:

Xác định khả năng ức chế peroxy hoá lipid thông qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), một trong những sản phẩm tạo ra bởi quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào (phương pháp của E.A. Makarova, 1989; J. Robak và cộng sự, 1988). Sản phẩm MDA có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở  $\lambda = 530 - 532$  nm.

##### 3.2.2. Tiến hành:

Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (pH= 7,4) ở nhiệt độ 0-5°C. Lấy dịch đồng thể, thêm vào các nồng độ mẫu thử và ủ ở 37°C trong 15 phút (tự oxy hóa) hoặc ủ với hệ Fenton (FeSO<sub>4</sub> 0,1 mM : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM theo tỉ lệ 1:1) trong 5 phút. Kết thúc phản ứng bằng acid tricloacetic 10%, ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với acid thiobarbituric 0,8% ở 100 °C trong 15 phút và đo màu ở  $\lambda = 532$  nm.

##### 3.2.3. Tính toán kết quả:

Hàm lượng MDA được tính theo công thức:

$$X = (OD_{\text{thử}} / OD_{\text{chuẩn}}) \times C_{\text{chuẩn}} \text{ (nM/ml)}$$

Hoạt tính chống oxy hoá (HTCO) được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = [(C_{\text{MDA chửng}} - C_{\text{MDA thử}}) / C_{\text{MDA chửng}}] \times 100$$

### 4. Hoá chất, thuốc thử:

- Đệm Phosphat (pH 7,4).
- NaCl 0,9%.

- Acid thiobarbituric 0,8%.
- Acid tricloacetic 10%.
- Malonyl dialdehyd (MDA).
- Hệ Fenton: FeSO<sub>4</sub> 0,1mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM.
- Trolox (RBI, USA).

### 5. Đánh giá kết quả:

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: M ± SEM (giá trị trung bình + sai số chuẩn) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm One-way ANOVA. Số liệu đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi P < 0,05 so với đối chứng (phần mềm kiểm định Sigma Stat 98).

### III. Kết quả và thảo luận

#### 1. Tác dụng chống stress:

- Cao lá *S. elliptica* có tác dụng chống stress ở liều 167 mg/kg thể trọng, thể hiện tác dụng phục hồi thời gian ngủ pentobarbital bị rút ngắn bởi stress so với lô đối chứng. Ở liều 83 mg/kg, tác dụng này chưa đạt ý nghĩa thống kê.

- Cao vỏ thân *S. elliptica* có tác dụng chống stress ở liều 158 mg/kg thể trọng, phục hồi thời gian ngủ pentobarbital bị rút ngắn bởi stress so với lô đối chứng. Ở liều 79 mg/kg, tác dụng này chưa đạt ý nghĩa thống kê.

- Vỏ thân *S. elliptica* có tác dụng mạnh hơn so với lá, và cả hai bộ phận đều có khuynh hướng tăng tác dụng ở liều tăng dần (bảng 1).

**Bảng 1:** Tác động của *Schefflera elliptica* lên thời gian ngủ của pentobarbital.

| Lô TN       | Số TN | Liều (mg/kg) | Nhóm bình thường                |                | Nhóm stress cô lập              |                |
|-------------|-------|--------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
|             |       |              | Thời gian ngủ (phút)<br>M ± SEM | P              | Thời gian ngủ (phút)<br>M ± SEM | P              |
| Đối chứng   | 10    | -            | 71,14 ± 4,53                    | Không đạt YNTK | 39,38 ± 2,97                    | # P<0,05       |
| Cao lá      | 10    | 83           | 73,68 ± 6,09                    | Không đạt YNTK | 46,23 ± 3,18                    | Không đạt YNTK |
|             | 10    | 167          | 66,39 ± 8,89                    | Không đạt YNTK | 52,53 ± 4,02                    | * P<0,05       |
| Cao vỏ thân | 10    | 79           | 70,68 ± 6,82                    | Không đạt YNTK | 44,84 ± 3,24                    | Không đạt YNTK |
|             | 10    | 158          | 62,06 ± 3,49                    | Không đạt YNTK | 66,51 ± 3,93                    | * P<0,05       |

Ký hiệu: # P<0,05 so với nhóm bình thường tương ứng; \* P<0,05 so với lô đối chứng tương ứng.

#### 1. Tác dụng chống oxy hóa in vitro:

Cao vỏ thân cho tác dụng ức chế sự tạo thành MDA mạnh hơn mẫu cao lá, đạt ý nghĩa thống kê ở nồng độ khảo sát 50 và 100 µg/ml ở hệ tự oxy hóa (bảng 2). Cao vỏ thân cũng thể hiện tác dụng mạnh trong hệ Fenton với HTCO bằng 22% ở nồng độ 25 µg/ml và tăng đến 75% ở nồng độ 100 µg/ml. Trong khi đó, HTCO của cao lá chỉ đạt 38% ở nồng độ 100 µg/ml (bảng 3). Tác dụng ức chế sự tạo thành MDA của cao vỏ thân trong hệ Fenton ở nồng độ 50 µg/ml tương

đương với Trolox (đồng phân tan trong nước của vitamin E) ở nồng độ 25 µg/ml.

Các kết quả ở bảng 2 và bảng 3 cho thấy cao vỏ thân *S. elliptica* thể hiện tác dụng chống oxy hoá mạnh hơn cao lá; do đó, chúng tôi tiến hành thử nghiệm tiếp trên mẫu saponin toàn phần được chiết từ vỏ thân để xác định xem nhóm hợp chất saponin có phải là hoạt chất quyết định tác dụng này hay không?

Kết quả biểu thị ở bảng 4 cho thấy saponin trong vỏ thân *S. elliptica* cho tác dụng ức chế sự

**Bảng 2 :** Kết quả khảo sát tác dụng chống oxy hoá của *Schefflera elliptica* (tự oxy hóa)

| Mẫu thử<br>(n=6) | Nồng độ TN<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Mật độ<br>quang | Nồng độ MDA<br>(nM/ml) | HTCO<br>(%) |
|------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------|
| Cao lá           | 0                                  | 0,518           | 22,632 $\pm$ 0,506     |             |
|                  | 5                                  | 0,488           | 21,328 $\pm$ 0,408     | 6           |
|                  | 25                                 | 0,457           | 19,946 $\pm$ 0,737     | 12          |
|                  | 50                                 | 0,422           | 18,445 $\pm$ 0,355*    | 19          |
|                  | 100                                | 0,391           | 17,058 $\pm$ 0,597*    | 25          |
| Cao vỏ thân      | 0                                  | 0,571           | 17,865 $\pm$ 0,744     |             |
|                  | 25                                 | 0,598           | 18,887 $\pm$ 0,838     | -5          |
|                  | 50                                 | 0,466           | 14,733 $\pm$ 0,802     | 18          |
|                  | 100                                | 0,383           | 12,110 $\pm$ 0,418*    | 33          |
| Trolox           | 25                                 | 0,248           | 8,484 $\pm$ 0,216*     | 62          |

**Bảng 3:** Kết quả khảo sát tác dụng chống oxy hoá của *Schefflera elliptica* (hệ Fenton)

| Mẫu thử<br>(n=6) | Nồng độ TN<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Mật độ<br>quang | Nồng độ MDA<br>(nM/ml) | HTCO<br>(%) |
|------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------|
| Cao lá           | 0                                  | 0,839           | 26,890 $\pm$ 0,338     |             |
|                  | 50                                 | 0,667           | 21,374 $\pm$ 0,310*    | 21          |
|                  | 100                                | 0,524           | 16,810 $\pm$ 0,160*    | 38          |
| Cao vỏ thân      | 0                                  | 0,839           | 26,890 $\pm$ 0,338     |             |
|                  | 25                                 | 0,651           | 20,888 $\pm$ 0,746*    | 22          |
|                  | 50                                 | 0,487           | 15,618 $\pm$ 0,174*    | 42          |
|                  | 100                                | 0,209           | 6,697 $\pm$ 0,446*     | 75          |
| Trolox           | 25                                 | 0,426           | 14,575 $\pm$ 0,105*    | 50          |

\* P &lt; 0,05.

hình thành MDA mạnh, thể hiện tác dụng ở những nồng độ nhỏ hơn 4 lần so với cao vỏ thân cụ thể như HTCO ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/ml}$  là 40%,

tăng lên 84% ở nồng độ 25  $\mu\text{g/ml}$  (hệ tự oxy hóa); HTCO là 45% ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , tăng lên 90% ở nồng độ 25  $\mu\text{g/ml}$  (hệ Fenton).

**Bảng 4:** Kết quả khảo sát tác dụng chống oxy hoá của saponin vỏ thân *Schefflera elliptica*

| Mẫu thử<br>(n=6) | Nồng độ TN<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Mật độ<br>quang | Nồng độ MDA<br>(nM/ml) | HTCO<br>(%) |
|------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------|
| Tự oxy hóa       | 0                                  | 0,592           | 20,507 $\pm$ 0,447     |             |
|                  | 2,5                                | 0,353           | 12,472 $\pm$ 0,242*    | 40          |
|                  | 5                                  | 0,272           | 8,439 $\pm$ 0,235*     | 54          |
|                  | 25                                 | 0,094           | 4,252 $\pm$ 0,383*     | 84          |
| Hệ Fenton        | 0                                  | 0,722           | 25,718 $\pm$ 0,568     |             |
|                  | 2,5                                | 0,399           | 14,213 $\pm$ 0,691*    | 45          |
|                  | 5                                  | 0,251           | 8,935 $\pm$ 0,409*     | 65          |
|                  | 25                                 | 0,075           | 2,666 $\pm$ 0,148*     | 90          |

\* P &lt; 0,05.

#### IV. Kết luận

Cao lá và cao vỏ thân *Schefflera elliptica* thể hiện tác dụng chống stress qua sự phục hồi thời gian ngủ bị rút ngắn bởi stress cô lập và đưa về trạng thái bình thường. Ngoài ra, cao lá và cao vỏ thân còn thể hiện tác dụng

chống oxy hoá qua việc ức chế sự tạo thành sản phẩm malonyl dialdehyd của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào não chuột nhắt trắng. Hợp chất saponin sơ bộ được xác định là hoạt chất quyết định tác dụng chống oxy hoá của vỏ thân *Schefflera elliptica*.

#### Tài liệu tham khảo

1). Trần Công Luận & cs. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ KHYD-0224, 2001; 2). Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Thị Thu Hương và Nguyễn Thới Nhâm. Công trình nghiên cứu khoa học 1987-2000 - Viện Dược liệu, 2001, 418; 3). Nguyễn Thị Thu Hương, Trần Mỹ Tiên. *Tạp chí Dược liệu*, tập 6, số 1/2001, 25-27; 4). Nguyễn Minh Khai, Phạm Thanh Trúc, Đỗ Thị Phương. *Tạp chí Dược liệu*, tập 6, số 6/2001, trang 186 – 189; 5). Nguyễn Quang Thường, Nguyễn Thị Bích, Nguyễn Gia Chấn, Đỗ Ngọc Sơn. *Tạp chí Dược học*, số 8/1996, 18-20.

*Tạp chí Dược liệu, tập 8, số 4/2003 (trang 118-122)*

### NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN HOẠT TÍNH RIBONUCLEOLYTIC CỦA NỌC RẮN HỔ MANG ĐEN

*Nguyễn Văn Thiết*

*Viện Công nghệ sinh học*

(Nhận bài ngày 11 tháng 4 năm 2003)

#### Summary

#### **Influence of Some Factors on Ribonucleolytic Activity of Black Cobra Venom**

*Influence of enzyme and substrate concentrations, ionic strength of buffers, pH and salts on activity of crude and partially purified RNase of cobra venom has been studied.*

*The obtained results show that RNase from Vietnamese black cobra (*Naja naja*) venom is different from all the other identified RNases not only in its extremely low optimal value of pH but also in non-linear activity dependence on the enzyme concentrations and a sigmoidal curve of saturation with the substrate. This enzyme expresses the maximal activity at the ionic strength of 10 mM of the reaction buffers. Concentrations over 70 mM of  $(NH_4)_2SO_4$  entirely and NaCl loses about 70% of the enzyme activity. No  $Mg^{2+}$  is needed for activation of this RNase.*

*Key words: Naja naja, Ribonucleasase, Enzyme Properties.*

#### I. Đặt vấn đề

Các loại nọc độc của động vật nói chung và nọc rắn nói riêng rất giàu các chất có hoạt tính sinh học như toxin, enzym... Trong số các enzym có trong nọc rắn, ribonuclease (RNase) được phát hiện là có khả năng chống ung thư [1, 4, 5, 7, 13] và chống HIV [6]. Mặt khác, các nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực công nghệ protein còn cho thấy một số RNase bình thường không có hoạt tính chống ung thư như RNase từ tụy bò (RNase A) hay tụy người,

nhưng có thể biến đổi được thành dạng có hoạt tính chống ung thư, mở ra triển vọng chế các dược phẩm cao cấp từ RNase để chữa căn bệnh hiểm nghèo này [2, 7, 9]. Trong các công trình nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã xác định được nọc rắn hổ mang đen có hoạt tính ribonucleolytic rất cao và pH tối ưu ( $pH_{opt}$ ) rất thấp [14]. Xét theo pH tối ưu, RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam hoàn toàn khác so với tất cả các enzym thuộc nhóm RNase đã biết đến từ trước tới nay.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố (nồng độ enzym và cơ chất, lực ion của dung dịch đệm, các loại muối thường dùng trong tách chiết và tinh chế enzym như NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) đến hoạt tính của enzym, nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam.

## II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nọc rắn hổ mang đen thô được mua ở làng nghề nuôi rắn xã Vĩnh Sơn, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc. Chế phẩm enzym RNase được làm sạch một phần bằng cách đun sôi cách thủy 5 phút, tủa phân đoạn bằng ammonium sulfat hay sắc ký trao đổi ion trên cột CM-cellulose.

Chế phẩm ARN (ARN tổng số của nấm men) được mua của hãng Sigma.

Hoạt tính RNase được xác định theo phương pháp đã mô tả trước đây [15], dựa trên nguyên lý của hiệu ứng hyperchrom, tức tăng hấp thụ ở vùng cực tím (260 nm) khi acid nucleic bị thủy phân, được đo trực tiếp trên máy quang phổ Diode Array SP 8452 Hewlett Packard hoặc trên máy GeneQuant RNA/DNA Calculator theo tăng  $\text{OD}_{260}$  sau 1 phút kể từ khi bắt đầu phản ứng.

Protein được xác định theo phương pháp Lowry hoặc phương pháp quang phổ ở 280 nm. Các hoá chất khác đều có độ sạch phân tích cao.

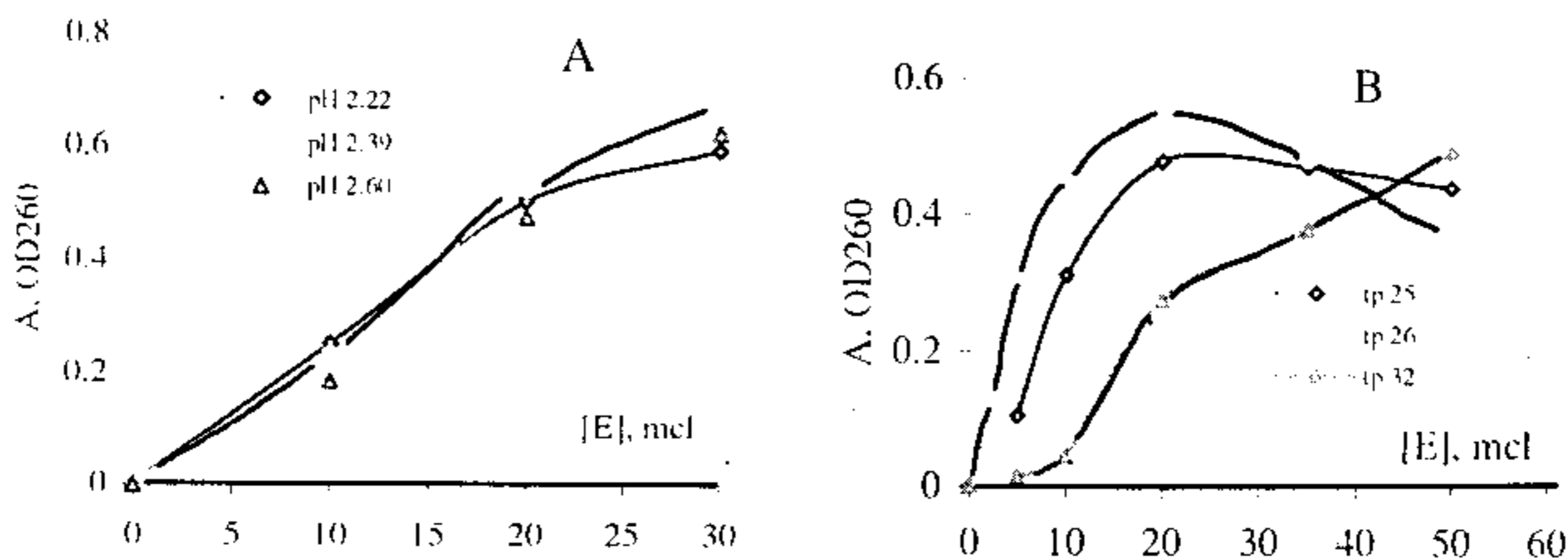
## III. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Sự có mặt của một enzym được phát hiện theo phản ứng đặc trưng mà nó xúc tác. Lượng enzym có mặt được xác định theo tốc độ của phản ứng. Do đường cong biểu diễn mối phụ thuộc tốc độ của phản ứng enzym vào thời gian rất phức tạp, nên trong thực tiễn, việc đo tốc độ của một phản ứng xúc tác enzym được quy về đo tốc độ ban đầu của

phản ứng. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến việc này, trong đó những yếu tố quan trọng nhất là nồng độ enzym, nồng độ cơ chất, pH và sự có mặt của các chất ức chế hay hoạt hoá enzym. Khi nghiên cứu RNase từ tuyến tụy lợn và nọc rắn hổ mang, chúng tôi không thể đo được vì quá trình thủy phân ARN xảy ra quá nhanh, có khoảng 70-90% lượng cơ chất bị thủy phân trong phút đầu tiên; vì vậy, việc xác định hoạt tính enzym trong tất cả các trường hợp được quy về đo tăng  $\text{OD}_{260}$  (lượng sản phẩm tạo thành) sau 1 phút kể từ khi bắt đầu phản ứng [16], trong khi các tác giả khác tiến hành phản ứng thủy phân ARN trong 15, thậm chí 30 phút, sau đó đo lượng sản phẩm tạo thành. Vì vậy, trong các nghiên cứu định lượng, nhất là các nghiên cứu về động học, nghiên cứu mối phụ thuộc tốc độ ban đầu của phản ứng vào các yếu tố xác định vận tốc phản ứng là rất cần thiết.

### 1. Mối phụ thuộc của hoạt tính RNase từ nọc rắn hổ mang vào nồng độ của enzym.

RNase trong nọc rắn thô và enzym nhận được sau sắc ký trao đổi ion đã được dùng để khảo sát mối phụ thuộc của hoạt tính vào nồng độ của enzym. Các kết quả nhận được cho thấy đối với nọc rắn thô, tốc độ ban đầu của phản ứng tỉ lệ tuyến tính với nồng độ enzym trong một khoảng nhất định. Tuy nhiên, ở  $\text{pH}_{\text{opt}} = 2,6$ , mối phụ thuộc này quan sát được trong một khoảng nồng độ lớn hơn so với các giá trị pH ngoài vùng tối ưu: các khoảng nồng độ có mối phụ thuộc tuyến tính A - [E] là 0 - 30 mcl E/ml hỗn hợp phản ứng ở pH = 2,6 và 0 - 20 mcl/ml ở các pH 2,22 và 2,39 (hình 1A). Đối với chế phẩm enzym được làm sạch một phần bằng sắc ký trao đổi ion, mối phụ thuộc này phức tạp hơn nhiều. Khi nồng độ enzym tăng trong khoảng 0 - 50 mcl/ml, hoạt tính của enzym đầu tiên tăng, sau đó giảm (hình 1B), ngoài ra, còn phụ thuộc vào vị trí của các phân đoạn trên sắc ký đồ.

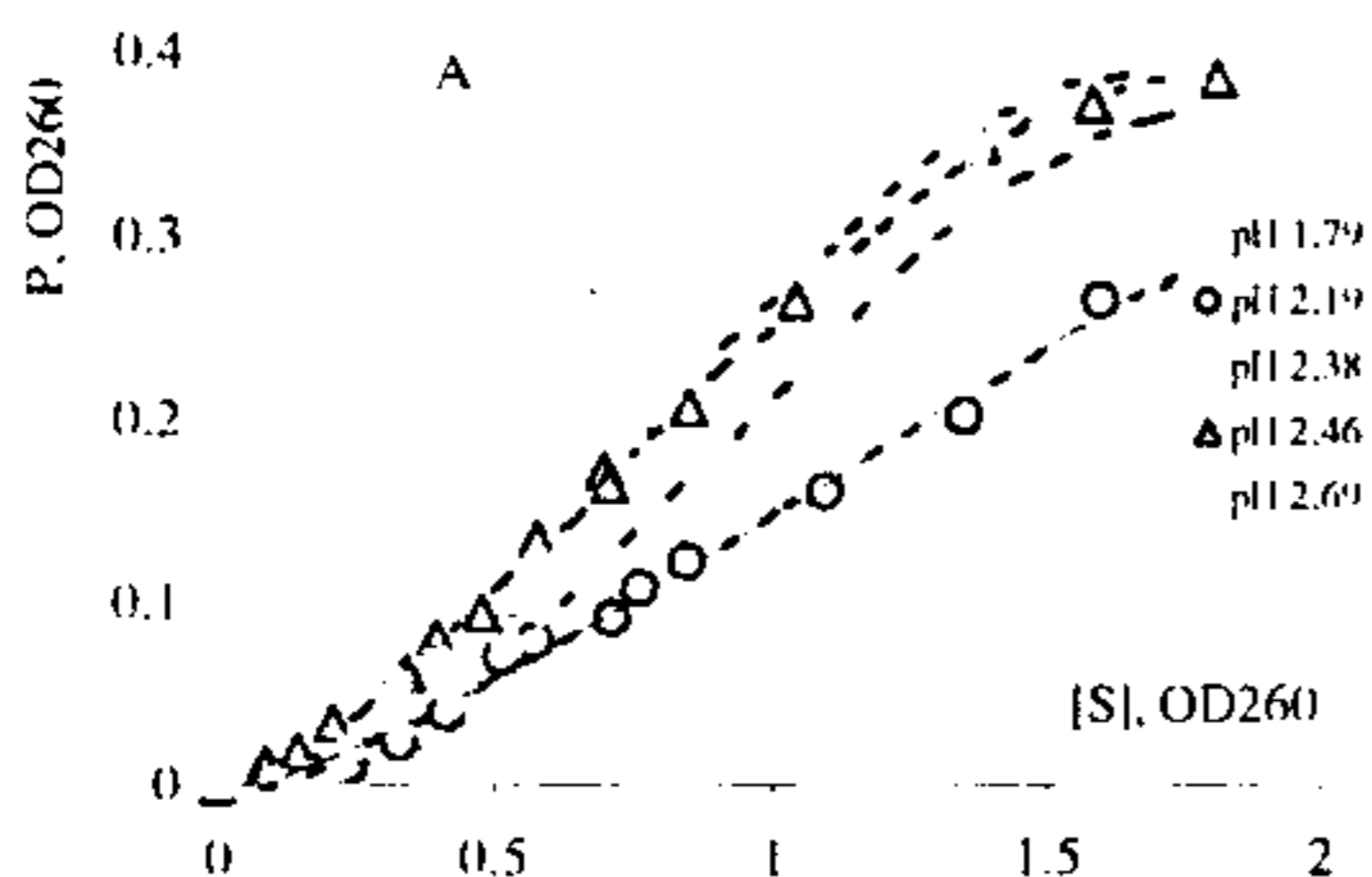


**Hình 1.** Mối phụ thuộc hoạt tính của RNase trong nọc rắn thô (pha với hàm lượng 0,625 mg nọc đông khô/ml đệm, A) và trong các chế phẩm enzym được làm sạch một phần (các đỉnh enzym khác nhau trong các tiêu phân thu được sau sắc ký trao đổi ion trên CM-cellulose, B)

Vấn đề này sẽ được đề cập đến sâu hơn trong một nghiên cứu khác về RNase bằng phương pháp sắc kí trao đổi ion.

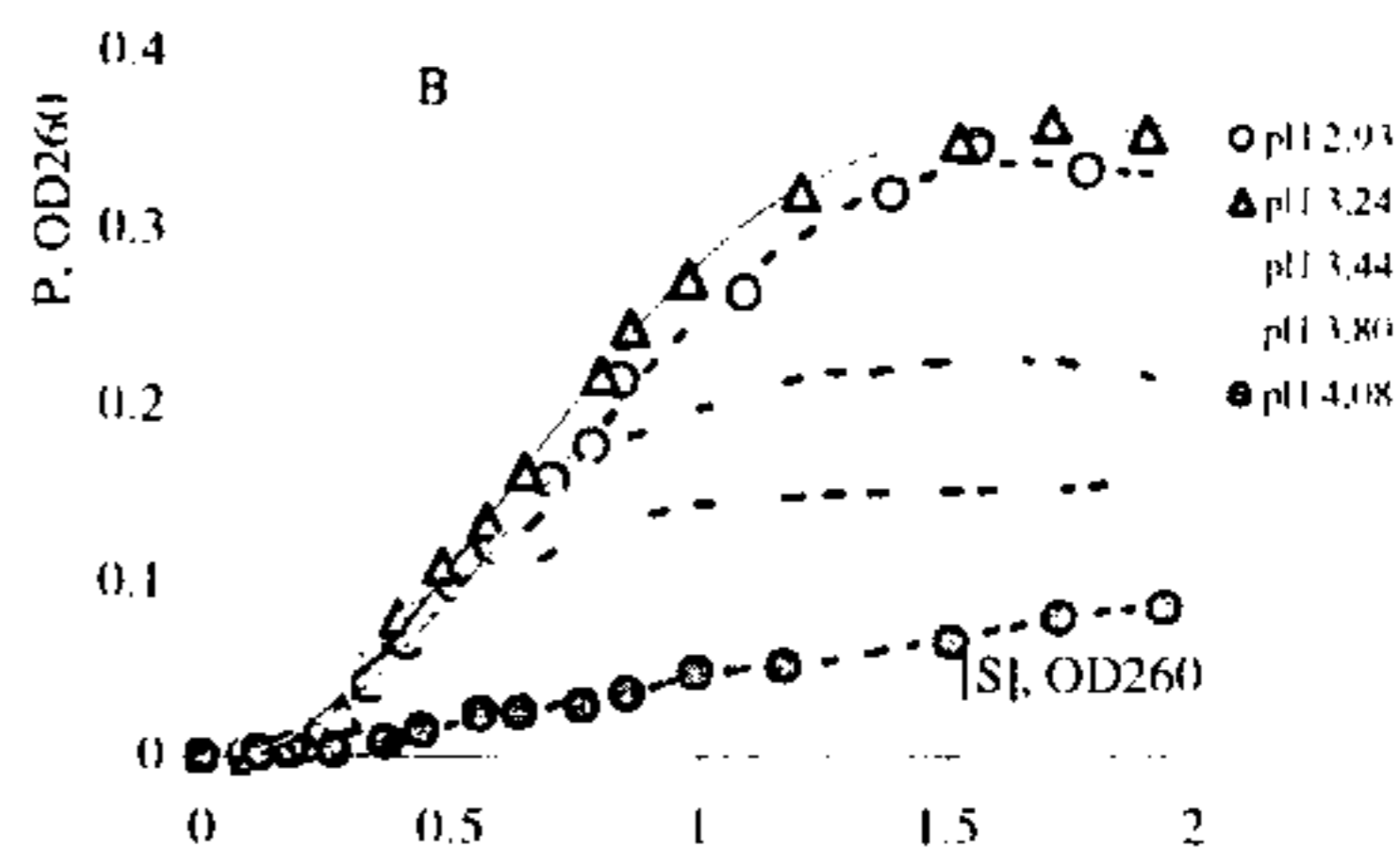
Dạng đường cong của mối phụ thuộc A - [E] cho thấy RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam rất giống với các enzym allosteric có khả năng liên hợp - phân li, tức là các enzym chứa nhiều dạng phân tử có khả năng biến đổi qua lại [8].

## 2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (ARN) lên hoạt tính của RNase



Mối phụ thuộc hoạt tính ribonucleolytic của nọc rắn hổ mang đen vào nồng độ cơ chất được nghiên cứu trong vùng pH 1,79 - 4,08. Kết quả các thí nghiệm này được biểu diễn ở hình 2.

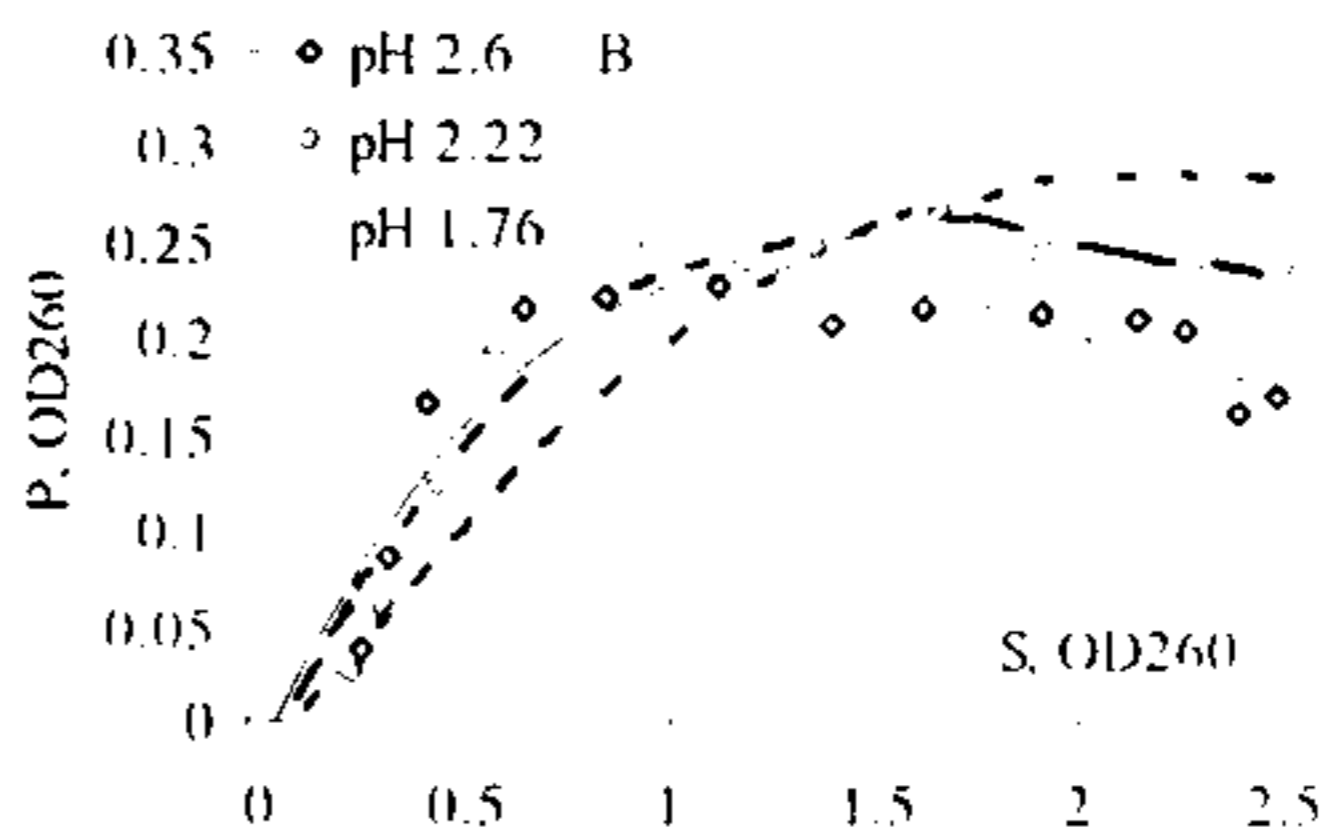
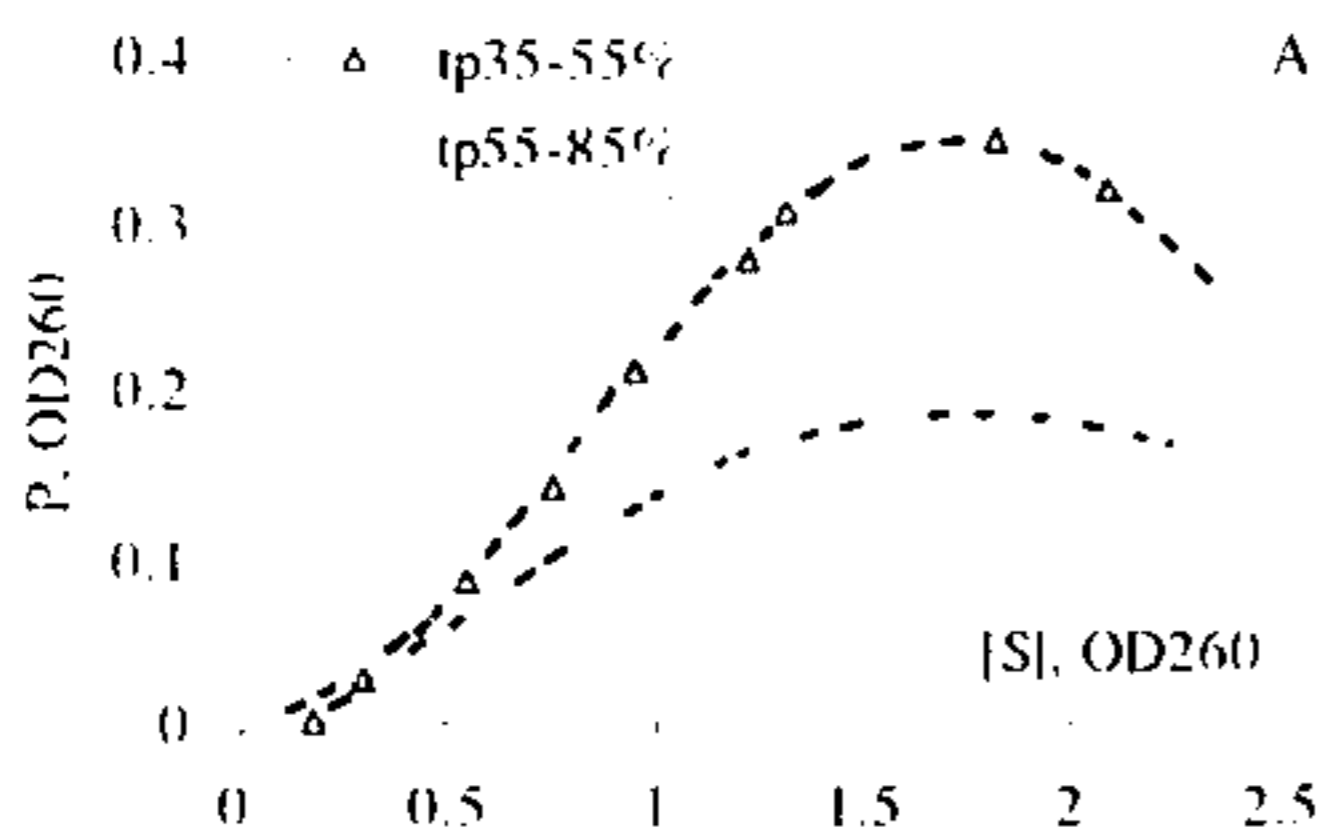
Trước đây, chúng tôi đã xác định được giá trị pH tối ưu cho hoạt tính ribonucleolytic trong nọc rắn đông khô là  $2,62 \pm 0,14$  [17]. Hình 2 cho thấy nọc rắn đông khô thể hiện hoạt tính ribonucleolytic cao nhất trong vùng pH tối ưu: đồ thị P - [S] ở giá trị pH = 2,69 nằm ở phía trên các đồ thị tương ứng ở tất cả các giá trị pH ngoài vùng pH<sub>opt</sub>.



Hình 2 . Mối phụ thuộc hoạt tính của nọc rắn đông khô vào nồng độ của cơ chất tại các pH khác nhau

Đường cong bão hoà với cơ chất (mối phụ thuộc P - [S]) ở tất cả các giá trị pH trong vùng từ 1,79 đến 4,08 đều không tuân theo động học Michaelis - Menten và đều có dạng sigma; ở các giá trị pH thấp, P (sản phẩm) gần như tỉ lệ tuyến tính với nồng độ cơ chất. Ngoài ra, pH càng cao, enzym đạt bão hoà càng sớm và ngược lại.

Mối phụ thuộc P - [S] đối với RNase nọc rắn trong các chế phẩm enzym được làm sạch một phần được trình bày ở hình 3.

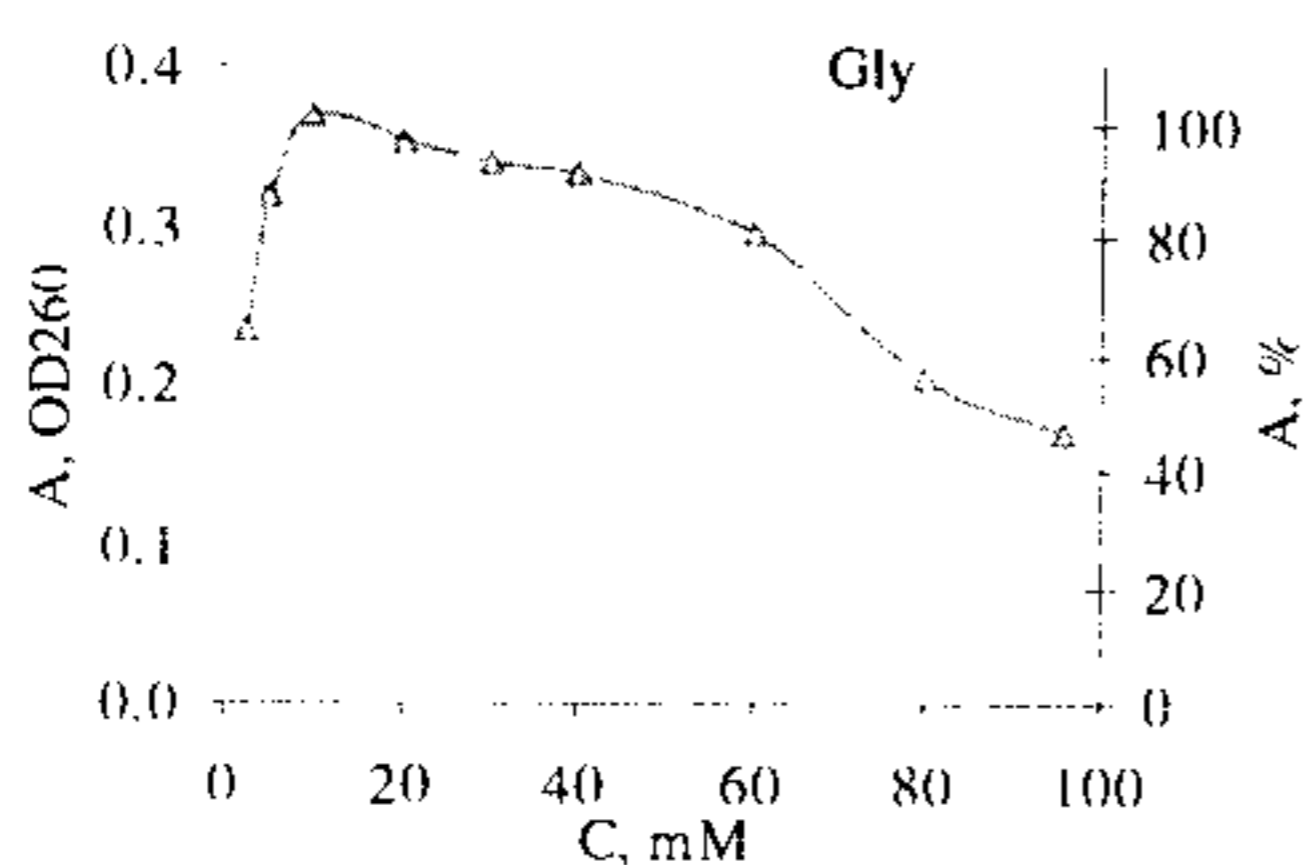


Hình 3 . Mối phụ thuộc hoạt tính của enzym được làm sạch một phần vào nồng độ của cơ chất ở các pH khác nhau (A - Enzym sau khi tủa phân đoạn bằng ammonium sulfat trong khoảng 35-55% và 55-85% bão hoà; B - Enzym sau sắc kí trao đổi ion ở pH 5,2 trên CM-cellulose)

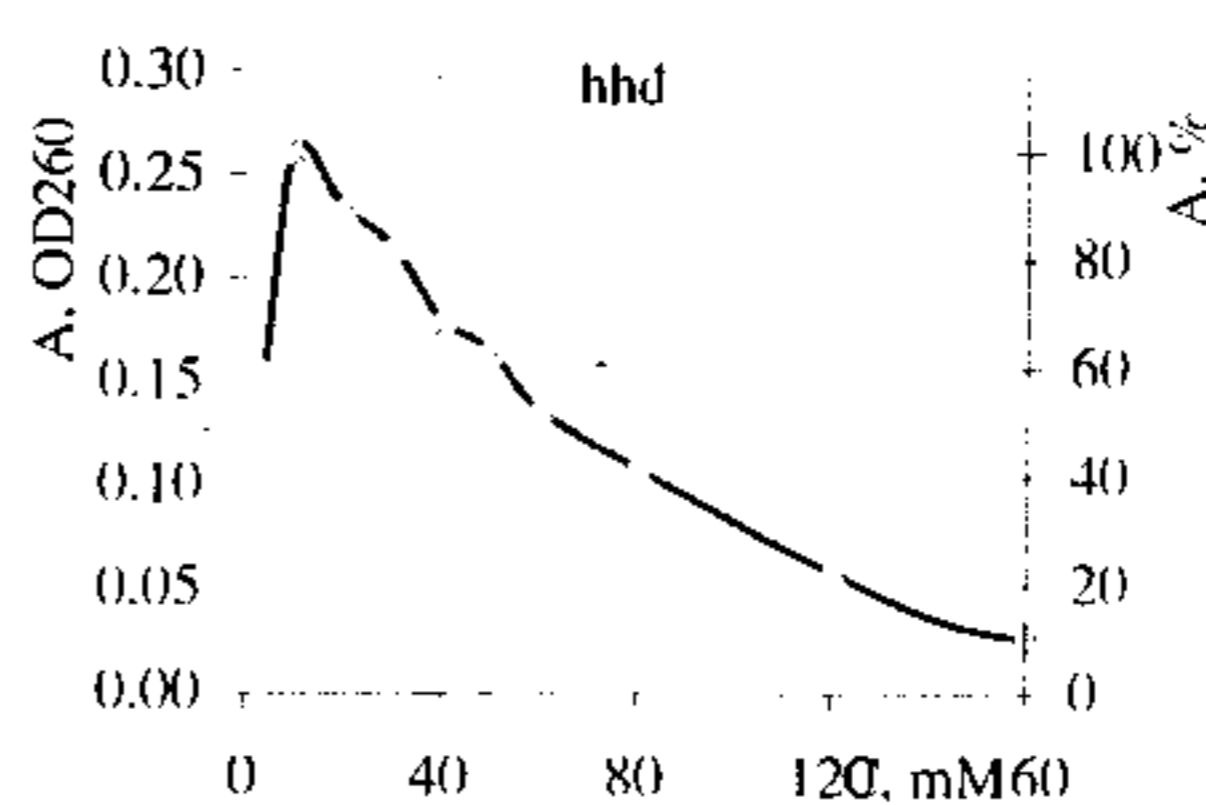


phân nghiên cứu mối phụ thuộc A - [E]. Theo chúng tôi, một trong những nguyên nhân quan trọng nhất là sự tồn tại nhiều dạng phân tử khác nhau của RNase trong nọc rắn hổ mang. Một số tác giả quan sát được dạng động học Michaelis - Menten của RNase A bằng phương pháp đo sản phẩm tạo thành sau 15 phút thủy phân. Điều này khẳng định dạng sigma của đồ thị P - [S] mà chúng tôi quan sát được đối với RNase trong nọc rắn hổ mang hoàn toàn không liên quan đến vấn đề không đo được tốc độ ban đầu của phản ứng.

### 3. Ảnh hưởng của lực ion của dung dịch đệm lên hoạt tính của RNase



Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi [14] cho thấy RNase trong nọc rắn hổ mang thể hiện hoạt tính cao nhất trong vùng pH rất acid (pH = 1 - 4), còn trong vùng trung tính, nó lại rất thấp. Nếu đo trong vùng trung tính mà chỉ sử dụng một lượng enzym ít như trong vùng acid thì hoạt tính enzym hầu như không xác định được. Vì vậy, trong các thí nghiệm nghiên cứu mối phụ thuộc hoạt tính của RNase từ nọc rắn vào lực ion của dung dịch đệm, chúng tôi chỉ khảo sát trong vùng acid với đệm glycin (Gly) và hỗn hợp đệm (hhd). Kết quả được trình bày ở hình 4.



**Hình 4.** Mối phụ thuộc hoạt tính ribonucleolytic của nọc rắn hổ mang đen vào lực ion của dung dịch đệm (nồng độ đệm)

Hình này cho thấy nồng độ đệm tối ưu của cả Gly và hỗn hợp đệm trong dịch hỗn hợp phản ứng thủy phân ARN do RNase nọc rắn hổ mang đen xúc tác là 10 mM. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đệm lên quá 10 mM thì hoạt tính của enzym giảm chậm trong đệm Gly và giảm rất nhanh trong hỗn hợp đệm. Hoạt tính RNase ở nồng độ 100 mM Gly bằng gần 50% hoạt tính của enzym ở nồng độ tối ưu; giá trị tương ứng đối với hỗn hợp đệm là khoảng 20% ở nồng độ 120 mM; khi nồng độ hỗn hợp đệm lớn hơn 150 mM, hoạt tính enzym chỉ còn dưới 10% so với ở nồng độ 10 mM. Hơn nữa, trong đệm Gly RNase nọc rắn thể hiện hoạt tính cao hơn trong hỗn hợp đệm. Vì vậy, hoạt tính của RNase từ nọc rắn hổ mang đen luôn được xác định với nồng độ đệm Gly là 10 mM.

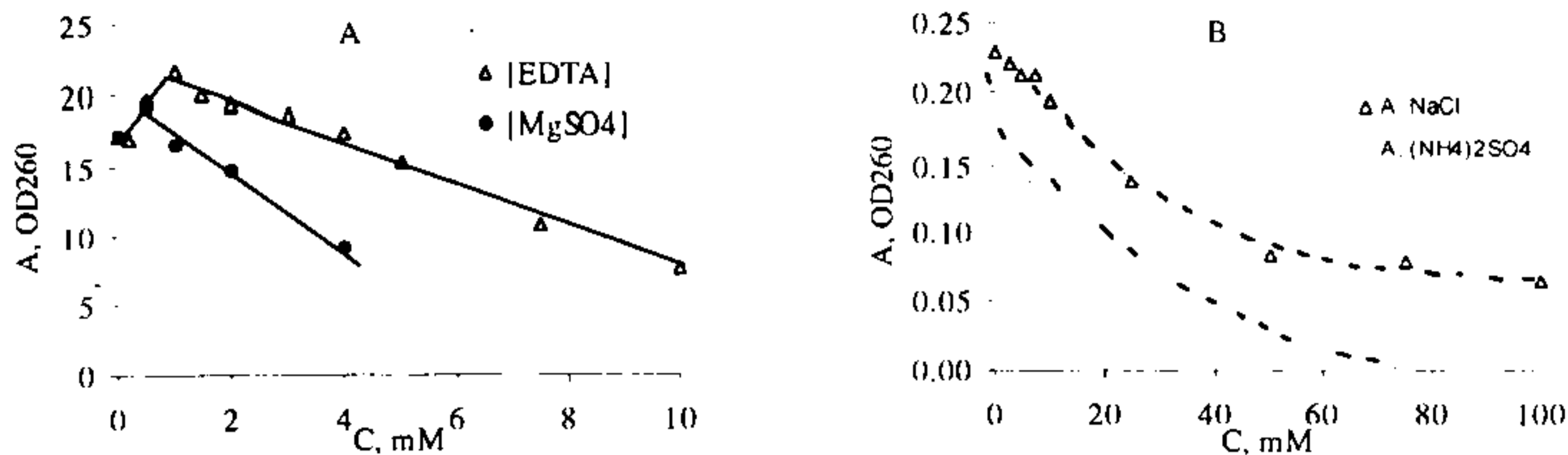
### 4. Ảnh hưởng của $Mg^{2+}$ , EDTA và một số muối thường sử dụng trong tách chiết và tinh chế enzym lên hoạt tính của RNase

Theo tài liệu, RNase từ nọc rắn hổ mang của Ấn Độ và vùng Trung Á của Liên Xô (cũ) cần cation  $Mg^{2+}$  để hoạt hoá [10, 18]. Vì vậy, chúng tôi đã kiểm tra ảnh hưởng của  $MgSO_4$  lên hoạt tính RNase trong nọc rắn hổ mang đen Việt Nam và xác định hoạt tính enzym khi có mặt chất tạo phức

EDTA để loại bỏ các cation hoá trị 2 trong hỗn hợp phản ứng. Kết quả được trình bày ở hình 5A

Hình 5A cho thấy khi nồng độ Mg tăng từ 0 đến 4 mM, hoạt tính của enzym tăng lên một chút ở nồng độ Mg < 1 mM, nhưng sau đó lại giảm và khi  $[Mg] = 4$  mM, hoạt tính RNase chỉ còn bằng 50% so với khi không có mặt Mg. Trong mối tương tác với Mg, RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam hoàn toàn khác so với một số RNase nọc rắn từ các nguồn gốc khác: Mg ở dải nồng độ này cần để hoạt hoá RNase từ nọc rắn hổ mang Ấn Độ [10] và làm tăng (đến 10 lần) hoạt tính của RNase từ vùng Trung Á của Liên Xô cũ [18]. Như vậy, Mg không đóng vai trò hoạt hoá RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam. Điều này càng được củng cố vì EDTA ở nồng độ 1 mM làm hoạt tính enzym tăng lên đến 25%, nhưng lại giảm gần như tuyến tính nếu nồng độ EDTA tiếp tục tăng (đến 25 mM). Việc hoạt tính enzym giảm khi nồng độ EDTA tiếp tục tăng có thể không liên quan đến hiệu ứng mất Mg liên kết trong enzym (nếu có), mà do ảnh hưởng của nó (anion) lên cấu trúc của enzym, dẫn đến giảm hoạt tính của RNase.

Các muối NaCl và  $(NH_4)_2SO_4$  ảnh hưởng mạnh lên hoạt tính RNase theo quan hệ nghịch đảo (hình



**Hình 5.** Ảnh hưởng của ion  $Mg^{2+}$  và một số muối lên hoạt tính ribonucleolytic của nọc rắn hổ mang đen

5B). Ở nồng độ ammonium sulfat >70 mM, enzym mất hoàn toàn hoạt tính; khi nồng độ NaCl >100 mM, hoạt tính của enzym chỉ còn gần 30% so với khi không có muối trong môi trường phản ứng. Như vậy, hoạt tính của RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam phụ thuộc rất nhiều vào lực ion và điều này cần được tính đến trong quá trình tinh chế enzym bằng ammonium sulfat và sắc kí trao đổi ion.

Các kết quả trên cùng với kết quả đã được công bố trước đây [14, 17] cho thấy RNase từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam là một enzym rất đặc biệt. Đây là enzym duy nhất trong nhóm RNase có pH tối ưu thấp trong vùng acid, với  $pH_{opt}$  tương đương với  $pH_{opt}$  của pepsin trong dạ dày của động vật bậc cao. Mỗi phụ thuộc hoạt tính của nó vào nồng độ rất phức tạp, không giống như các RNase khác trong nhóm. Về mặt này, RNase trong nọc rắn hổ mang đen Việt Nam giống như một enzym allosteric tồn tại dưới dạng một hệ thống cân bằng

của nhiều phân tử khác nhau có khả năng biến đổi qua lại [8]. Một số RNase cũng có nhiều dạng phân tử khác nhau [3].

#### IV. Kết luận

1. Mối phụ thuộc giữa hoạt tính và nồng độ của RNase từ nọc rắn hổ mang đen không tuyến tính, phản ánh các đặc điểm cấu trúc phức tạp của enzym này.
2. Đồ thị biểu diễn mối phụ thuộc tốc độ phản ứng vào cơ chất của RNase nọc rắn hổ mang đen có dạng sigma, nồng độ cơ chất bão hoà enzym giảm khi pH tăng.
3. RNase từ nọc rắn hổ mang đen không cần ion Mg cho hoạt tính xúc tác.
4. Hoạt tính của RNase từ nọc rắn hổ mang đen phụ thuộc mạnh vào lực ion, đạt cao nhất ở nồng độ đệm 10 mM và khi nồng độ muối trong hỗn hợp phản ứng tăng thì hoạt tính enzym giảm mạnh.

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Ardelt W., Mikulski S. M., Shogen K. (1991). *JBC*, 266(1), 245-251; 2). Bretscher L.E., Abel R.L., Raines R.T. (2000). *J. Biol. Chem.* 275(14), 9893 - 9896; 3). Deustcher M.P. (1993). *JBC*, 268(18), 13011-13014; 4). Endo Y., Huber P. W., Wool I. G. (1983). *JBC*, 258(4), 2662-2667; 5). Jordanov M. S., Ryabinina O. P., Wong J. et al. (2000). *Cancer Res.*, 60(7), 1983-1994; 6). Kilani A.F., Phong Trang, Jo S., Hsu A., Kim J., Nepomuceno E., Liou K., Liu F. (2000). *J. Biol. Chem.* 275(14), 10611 - 10622; 7). Klink T.A., Raines R.T. (2000). *J. Biol. Chem.* 275(23), 17463 - 17467; 8). Kurganov B.I. *Allosteric enzymes*, Moscow 1978; 9). Leland P.A., Staniszewski K.E., Kim B.-M., Raines R.T. (2001). *J. Biol. Chem.* 276(36), 20564 - 20567; 10). Mahalakshmi Y. V., Jagannadham M. V. (2000). Pandit M. W. *Life*, 49, 309-316; 11). Piccoli R., De Lorenzo C., Melck D., D'Alessio G. (1993). *Abstr. 3rd Int. Meet. Ribonucleases: Chem. Biol. Biotechnol.*, GP srl Pubbliche Relazioni, Napels, Italy, p. 11; 12). Saxena S. K., Gravell M., Wu Y.-N. et al. (1996). *JBC*, 271(34), 20783-20788; 13). Saxena S. K., Sirdeshmukh R., Ardelt W. et al. (2002). *JBC*, 277(17), 15142-15146; 14). Nguyễn Văn Thiết, Nguyễn Hoàng Tĩnh (2002). Nghiên cứu một số tính chất của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen (*Naja naja*). Tuyển tập Báo cáo khoa học của Hội nghị Khoa học Hội Hoá sinh Y Dược Hà Nội và các tỉnh phía bắc. Đồ Sơn - Hải Phòng, 2-3/8/2002, tr.82-92; 15). Nguyễn Văn Thiết, Trần Thị Thơm, Trần Đình Toại. (1995). *T/c Sinh học*, t. 17, số 3, tr. 59 - 42; 16). Nguyễn Văn Thiết (2003). *T/c Sinh học*, tập 24, số 3 tháng 9 năm 2002, tr.59-64; 17). Nguyễn Văn Thiết, Ngô Thị Hải Yến, Trần Đình Toại. Các Tính chất hoá lý và sinh học của Ribonuclease tách từ nọc rắn hổ mang (*N. naja*) của Việt Nam. Tạp chí Hoá học (đã nhận bài); 18). Vasilenko S. K., Babkina G. I. (1965). *Biokhimiya*, 30 (4), 705-712.

## VỀ CÂY RÁY Ở VIỆT NAM

Trần Công Khánh<sup>(1)</sup>, Nguyễn Văn Dư<sup>(2)</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm nghiên cứu và phát triển cây thuốc dân tộc cổ truyền (CREDEP),

<sup>2</sup> Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật

(Nhận bài ngày 20 tháng 2 năm 2003)

### Summary

#### On the “Ray” Plant in Vietnam

Several species are known under the common name of “Ray” in Vietnam. The paper provides anatomical grounds to distinguish *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don from *Alocasia odora* (Lindl.) K. Koch., the most interesting medicinally and often confused species.

Key words: *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don, *Alocasia odora* (Lindl.) K. Koch., Flora of Vietnam.

#### Đặt vấn đề

Gần đây, một số bài báo đề cập đến cây ráy và những ứng dụng làm thuốc của củ ráy theo kinh nghiệm dân gian. Hầu hết các sách đều nêu cây “Ráy” hoặc “Ráy đại” với các tên khoa học khác nhau. Mặt khác, nhiều cây thuộc các chi Ráy (*Alocasia*), Khoai môn (*Colocasia*), Khoai sấp (*Xanthosoma*)... cùng họ Ráy (Araceae), nhưng có hình dạng bên ngoài khá giống nhau, như phiến lá nguyên, hình trứng hoặc gần tròn, to như cái nón hoặc hơn, đầu lá nhọn, gốc lá chia 2 thùy sâu, cuống lá dài v.v..., nếu không thấy cụm hoa thì rất khó phân biệt. Có khi chúng lại khác nhau ở cách đính nõn trong bầu với những nõn rất nhỏ mà mắt thường không nhìn thấy.

Để làm rõ vấn đề này và tránh nhầm lẫn, chúng tôi đã xác định tên khoa học và cách nhận dạng cây ráy, đồng thời, từng bước xác định hoạt chất và tác dụng làm thuốc của nó và những loài có liên quan.

Trên thế giới, chi Ráy có 60-70 loài. Ở Việt Nam, theo F. Gagnepain [11] có 7 loài, P. H. Hồ [7] 11 loài và N. V. Dư [6] 10 loài. Trong thông báo này, chúng tôi chỉ đề cập đến một số loài liên quan đến tên ráy hoặc ráy đại có trong các tài liệu thường gặp ở Việt Nam, đó là:

- *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don, *A. macrorrhiza* (L.) Schott: Ráy [7,8], ráy đại [8], khoai sấp [2,6,8].

- *Alocasia odora* C. Koch: Ráy [1], ráy đại, độc mừng, ráy bạc hà [6], mừng thơm [2], bạc hà [7].

- *Alocasia indica* (Lour.) Kunth: Ráy [7], ráy Ấn [7].

- *Alocasia longiloba* Miq.: Ráy [3]

- *Colocasia macrorrhiza* Schott: Ráy [1]

Dưới đây là những vấn đề đã được làm rõ, hoặc cần thống nhất tên gọi để tránh nhầm lẫn.

**1. Cách viết tên Latin:** Theo các nhà phân loại thực vật nước ngoài, tên *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don đã được đổi thành *A. macrorrhizos* (L.) G. Don. Tận cùng -zos là giống cái, cho phù hợp với tên chi *Alocasia* là giống cái.

**2. Các tên nên bỏ:** Giữ lại tên *ráy* để chỉ loài *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don và *ráy đại* để đặt cho loài *Alocasia odora* C. Koch. được mô tả dưới đây. Những tên khác trong các tài liệu được trích dẫn trên đây nên loại bỏ với lý do sau:

- **Khoai sấp:** Không nên dùng để chỉ loài *A. macrorrhizos*, vì dễ nhầm lẫn với loài *Xanthosoma nigrum* (Vell.) Mansf. cũng có tên là khoai sấp [7], và thân rễ cây này to như thân cây chuối nhỏ, không có dạng như các loại “khoai” thông thường.

- **Độc mừng:** Nên dùng để chỉ loài *Colocasia gigantea* (Bl.) Hook. f. (syn.: *C. indica* Hassk.). Cuống lá của cây này được dùng để nấu ăn.

- **Bạc hà, ráy bạc hà, mừng thơm:** có trong một số tài liệu, để chỉ loài *Alocasia odora* C. Koch. là không thích hợp. Loài này mọc hoang, lá và thân rễ rất ngứa, không ai trồng để lấy lá và cuống dùng để ăn [7]. Có lẽ đây là sự nhầm lẫn với cây

dọc mừng nói trên.

### 3. Các loài mang tên Ráy:

#### 3.1. *Alocasia macrorrhizos* (L.) G. Don, 1839

Tên đồng nghĩa: *Arum macrorrhizon* L., 1753, Sp. Pl. ed. 1: 965; *Colocasia macrorrhiza* (L.) Schott, 1832. - *Arum indicum* Lour., 1790, Fl. Cochinch. 536. - *Colocasia indica* (Lour.) Kunth, 1841. - *Alocasia indica* (Lour.) Spach, 1846.

Tên Việt Nam: Ráy.

Cây thảo to, sống nhiều năm, cao đến 1 m, đường kính khoảng 15 cm. Thân rễ hình trụ mập. Lá có cuống dài hơn 1 m, phần bẹ chiếm 1/2 cuống, thường có vân tía; phiến lá hình mũi tên đến hình trứng rộng, đầu nhọn, mép hơi lượn sóng, gốc chia 2 thùy tròn, sâu đến sát đầu cuống lá, không có phần dính nhau, màu xanh lục sẫm ở mặt trên, nhạt hơn ở mặt dưới. Bám lá có nhựa mủ trắng như sữa. Cụm hoa là bông mo, thường từng cặp ở kẽ lá; cuống bông mo vượt ra khỏi lá khi hoa nở; mo dài 35 cm, ống mo cuộn lại, hình trứng hoặc bầu dục thuôn, dài 4-6 cm, đường kính 2,5-3 cm, màu lục sẫm; phiến mo thẳng, mở hoàn toàn khi hoa nở, màu vàng rơm; bông nạc, dài 25-34 cm, phần phụ thẳng, dài 15-20 cm, thường gấp rưỡi phần mang hoa đơn tính ở dưới, màu vàng nhạt. Quả mọng.

Loài này thường mọc hoang gần nơi có làng bản, hoặc theo tài liệu [2], cây được trồng để lấy "củ" ăn (sau khi đã luộc kỹ để loại chất gây

ngứa). Đã gặp cây có hoa ở Yên Thế (Bắc Giang), Viêng Chăn (Lào).

#### 3.2. *Alocasia odora* (Lindl.) K.Koch, 1854

Tên đồng nghĩa: *Arum odorum* Roxb., 1814. Nomen nudum.

Tên Việt Nam: Ráy đại.

Cây thảo to, sống nhiều năm, cao đến 2 m hoặc hơn, đường kính 15 cm. Thân rễ hình trụ mập. Lá nhiều, tập trung ở đầu thân rễ; cuống lá dài 1 m hoặc hơn, màu xanh lục, có khi pha nâu, không có vân tía; phần bẹ chiếm 2/3 cuống; phiến lá hình trứng rộng, dài 100 cm, rộng 70 cm, gốc lá chia 2 thùy sâu tròn, dính liền nhau một đoạn dài 2-4 cm ở gần sát đầu cuống lá, đầu lá tù. Cụm hoa là bông mo, cuống bông mo dài 25-35 cm, đường kính 1,5 cm, mo dài 17-20 cm; ống mo cuộn lại, hình trứng thuôn, dài 5-7 cm, đường kính 2,5-3,5 cm; phiến mo hình máng cong như lưỡi liềm, hoặc chỉ cong ở phần đầu, màu xanh lam, dài 15-24 cm; bông nạc ngắn hơn mo, phần phụ màu trắng hoặc lam nhạt, hơi cong, dài 6-8,5 cm, bằng hơn nửa đến khoảng 2/3 chiều dài của phần mang hoa đơn tính ở dưới, bề mặt có đường vân dạng vỏ nãi. Quả mọng, khi chín màu đỏ.

Loài này rất phổ biến ở Việt Nam, thường mọc hoang ở rừng ẩm, ở độ cao đến 1000 m (gần đỉnh núi Ba Vì). Những cây lâu năm cao to như cây chuối.

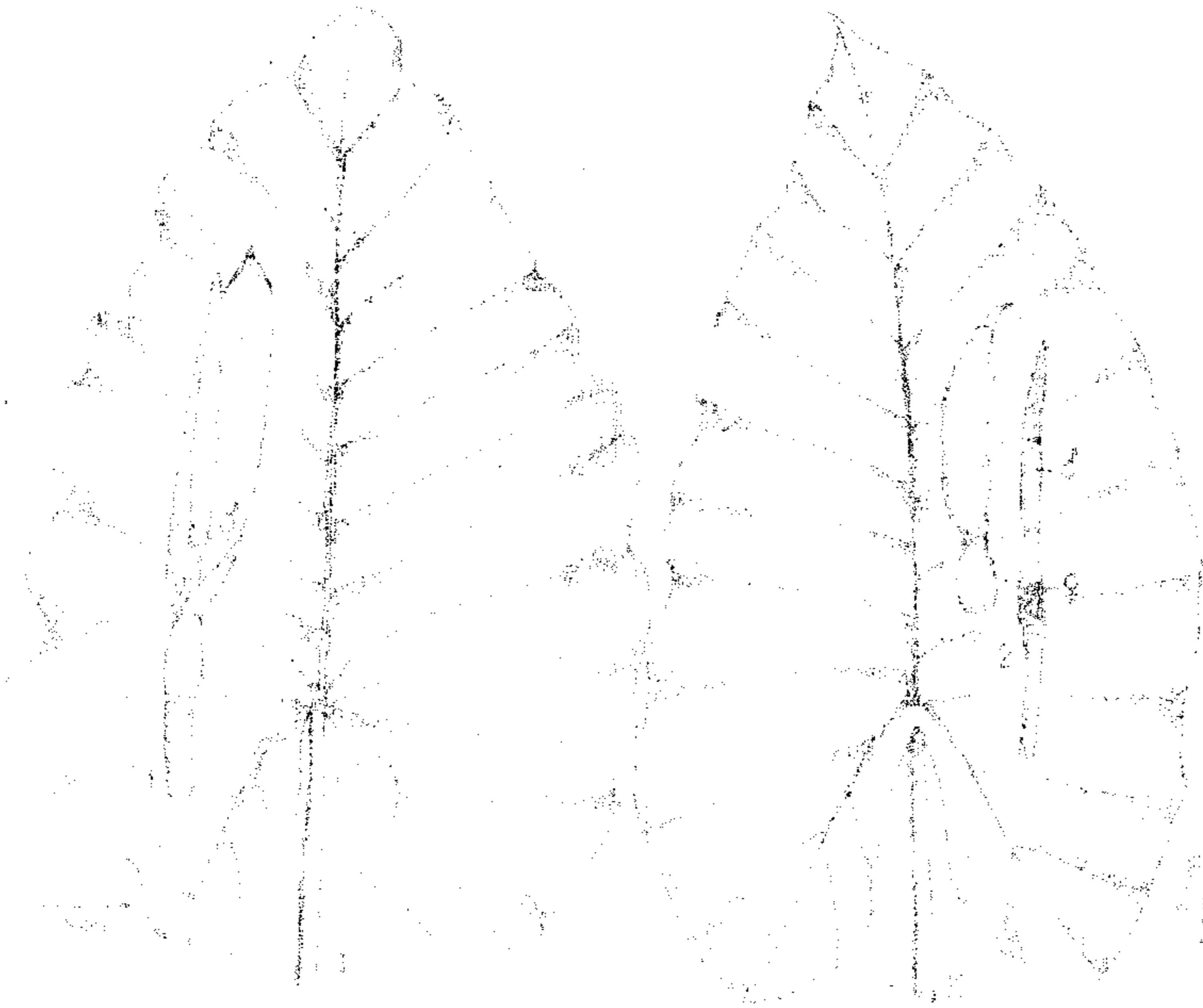
Bảng sau nêu sự khác biệt giữa 2 loài:

| Đặc điểm chính                      | <i>Alocasia macrorrhizos</i>   | <i>Alocasia odora</i>   |
|-------------------------------------|--|---|
| Hai thùy ở gốc phiến lá             | Không có phần dính liền  | Có phần dính liền dài 2-4 cm  |
| Nhựa mủ                             | Màu trắng như sữa  | Không   |
| Phiến mo                            | Thẳng, màu vàng rơm, mở hoàn toàn  | Hình lòng máng, cong như lưỡi liềm, hoặc chỉ cong ở phần đầu, màu xanh lam        |
| Phần phụ của bông nạc               | Thẳng, dài 15-20 cm, màu vàng nhạt, bề mặt không có đường vân dạng vỏ nãi. | Hơi cong, dài 6-8,5 cm, màu trắng hoặc lam nhạt, bề mặt có đường vân dạng vỏ nãi. |
| Tỷ lệ giữa phần phụ / phần mang hoa | Khoảng 1,50  | Khoảng 0,55 - 0,70  |

Trong tự nhiên, rất khó phân biệt hai loài khi chúng chưa có hoa.

### 4. Ứng dụng

Trước đây, do nhầm lẫn, nên trong các sách cây thuốc và công trình nghiên cứu, thân rễ của hai loài trên đều được gọi dưới tên chung là "củ" ráy hay dã vu. Loại thân rễ này có vị rất ngứa, tính lạnh và



I. *Alocasia macrorrhizos*: Lá và cụm hoa (1); II- *A. odora*: Lá và cụm hoa đã tách rời mo, thấy toàn bộ bông nạc mang hoa đực và hoa cái (2)

có độc được dùng theo kinh nghiệm dân gian để xát vào nơi bị ngứa do chàm phải lá han; giã đắp chữa rắn cắn, sưng vú; nấu nước tắm chữa mề đay, lở ngứa, vết thương; chế cao dán mụn nhọt. Ở Campuchia, người ta cũng dùng “củ” ráy để chữa ghẻ, ngứa. Ở Trung Quốc, “củ” chữa sốt rét, thũng độc, lở ngứa. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và

tác dụng chống gốc tự do của flavonoid chiết từ “củ” ráy. Flavonoid này đã được thử nghiệm đối với vết loét mạn tính ở các bệnh nhân phong, thấy có tác dụng tích cực [5].

Nhìn chung, các công dụng nêu trên cần được kiểm tra lại và xác định loài ráy nào có thể dùng làm thuốc. Nếu cả hai loài đều dùng được thì hoạt chất của loài nào cao hơn.

#### Tài liệu tham khảo

- 1). Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, XB lần thứ 6. NXB KH-KT, Hà Nội 1991; 2). Lê Khả Kế (chủ biên). Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam. Tập 5. NXB KH-KT, Hà Nội 1975; 3). Lê Trần Đức. Cây thuốc Việt Nam - Trồng hái, chế biến, trị bệnh ban đầu. NXB Nông nghiệp, Hà Nội 1997; 4). Li Hen (chủ biên). Thực vật chí Trung Quốc, 13 (2): 67, 75, 1979 (Trung văn); 5). Mai Mạnh Tuấn, Trần Văn Hiền, Trần Đăng Đức. Đánh giá tác dụng của kem *Alocasia* 2% điều trị tại chỗ vết loét mạn tính trên bệnh nhân phong. Kỷ yếu công trình NCKH 2001-2002 của Viện YHCT Việt Nam, Hà Nội 2002, tr. 329-335; 6). Nguyễn Văn Dư. *Tap chí Sinh học*, tập 16(4): 108-115, 1994; 7). Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam, tập 3(1). Montréal 1993; 8). Viện Dược liệu. Cây thuốc Việt Nam. NXB KH-KT, Hà Nội 1990; 9). Engler, A & Krause, K. (1920). Additamentum ad Araceae-Philodendrondeae, Araceae-Colocasioideae. In A. Engler (ed.), *Das Pflanzenreich* 71 (IV. 23E): 3-132; 10). Furtado. C.X. *Gardens Bulletin*, S.S., Vol. XI, 244-257, 1941; 11). Gagnepain, F., Araceae, in H. Lecomte, FGI, tome 6, Fasc. 9, Paris 1942; 12). Hay, A. & R. Wise. *Blumea* 35: 499-545, 1991; 13). Hay, A. *Garden Bull. Singapore* 50: 221-334, 1998; 14). Hay, A. *Garden Bull. Singapore* 51: 1-41, 1999; 15). Rafael Govaert & David G. Frodin. World checklist and bibliography of Araceae. Published by the Royal Botanic Gardens, Kew 2002.

# THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA TINH DẦU GAI XANH Ở VIỆT NAM

Trần Huy Thái, Trần Minh Hợi, Vũ Thị My

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

(Nhận bài ngày 26 tháng 1 năm 2003)

## Summary

### Chemical Composition of Essential Oil of *Severinia monophylla* in Vietnam

*Severinia monophylla* is the small tree, leaves glabrous, flowers white, fruits 1cm large. This plant distributes in many North Vietnam provinces. The yield of essential oil from leaves and fruits was 0.2 percent by air-dry material. 37 constituents of essential oil were identified. The essential oil was analysed by GC/MS. The main constituents of essential oil were: caryophyllen (17.2%), sesquiphellandren (15.1%) and  $\alpha$ -caryophyllen (13.8%).

**Key words:** *Severinia monophylla*, Essential Oil, Chemical Composition.

## 1. Mở đầu

Chi Gai xanh (*Severinia*) thuộc họ Cam (Rutaceae) chỉ có một loài là gai xanh hay gai tầm xoong, cam đắng (*Severinia monophylla* (L.) Tan.) [*Limonia monophylla* L.; *Atalantia bilocularis* Wall.] [1,2]. Theo kinh nghiệm dân gian, rễ gai xanh sắc hay ngâm rượu uống chữa tê thấp; quả hấp với đường chữa ho, hen, cảm, sốt [1,2]. Trong bài báo này, chúng tôi muốn trình bày một số kết quả về tinh dầu và thành phần hoá học của tinh dầu cây gai xanh.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Lá và quả cây gai xanh thu ở Mê Linh, Vĩnh Phúc. Tiêu bản thực vật được lưu giữ ở phòng Tài nguyên thực vật, Viện sinh thái và tài nguyên sinh vật.

Xác định hàm lượng tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn theo hơi nước có hồi lưu trong thiết bị Clevenger; định tính và định lượng các thành phần hóa học của tinh dầu bằng phương pháp Sắc ký khí - khối phổ (GC/MS) [5, 6]. Tinh dầu được làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , để trong tủ lạnh ở nhiệt độ  $< 5^\circ\text{C}$ ; Thiết bị: GC-MSD: Sắc ký khí HP 6890 ghép nối với Mass Selective Detector Agilent 5973. Cột HP-5MS có kích thước 0,25 $\mu\text{m}$

x 30m x 0,25mm và HP-1 có kích thước 0,25 $\mu\text{m}$  x 30m x 0,32mm. Chương trình nhiệt độ với điều kiện 60 $^\circ\text{C}$  (2 min) tăng nhiệt độ 4 $^\circ/\text{min}$  cho đến 220 $^\circ\text{C}$ , sau đó lại tăng nhiệt độ 20 $^\circ/\text{min}$  cho đến 260 $^\circ\text{C}$ . Khí mang He. Các chất được so sánh và xác định trên thư viện khối phổ: NIST 98.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Mô tả và phân bố:

Gai xanh là một cây nhỏ, cao 1-2m. Cành nhẵn, có gai thẳng dài 3-4cm ở kẽ lá. Lá mọc so le, hình trái xoan, dài 1,5-5cm, góc thuôn hẹp, đầu tù hoặc lõm, phiến dày, cứng, nhẵn, có điểm tuyến. Hoa trắng gần như không cuống, mọc tụ tập ở kẽ lá. Quả nạc, hình cầu, màu đen, có 2 hạt. Mùa hoa: tháng 6-8; mùa quả: tháng 9-12. Cây mọc phổ biến ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam như Hoà Bình, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Tuyên Quang, các tỉnh duyên hải miền Trung và phía Nam Trung Quốc.

### 3.2. Thành phần hoá học của tinh dầu:

Hàm lượng tinh dầu từ lá và quả đạt 0,2% theo nguyên liệu khô không khí. Tinh dầu là chất lỏng không màu, mùi thơm, có tỷ trọng nhẹ hơn nước.

Bằng phương pháp sắc ký - khối phổ, chúng tôi đã thu được 37 hợp chất của tinh dầu như trình bày trong bảng sau:

Thành phần hoá học của tinh dầu từ lá và quả cây gai xanh

| Số TT | Hợp chất                              | Tỷ lệ % |
|-------|---------------------------------------|---------|
| 1     | 1S- $\alpha$ -pinen                   | 0,12    |
| 2     | $\beta$ -phellandren                  | 0,16    |
| 3     | $\beta$ -pinen                        | 0,96    |
| 4     | $\beta$ -myrcen                       | 2,07    |
| 5     | D-limonen                             | 2,66    |
| 6     | 1,3,7 octatrien, 3,7 dimethyl         | 0,31    |
| 7     | 2-furanmethenol, 5-ethenyl tetrahydro | 1,78    |
| 8     | cis-linanol oxid                      | 2,5     |

|           |   |              |
|-----------|---|--------------|
| 9         | 1,6 octadien-3-ol, 3,7 dimethyl                             | 0,88         |
| 10        | decanal   | 4,29         |
| 11        | 4-careen  | 0,65         |
| 12        | phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)                          | 0,53         |
| 13        | copaen  | 0,41         |
| 14        | cyclohexan, 1-ethenyl-1-methyl                              | 0,70         |
| 15        | dodecanal   | 3,58         |
| <b>16</b> | <b>caryophyllen</b>   | <b>17,2</b>  |
| <b>17</b> | <b><math>\alpha</math>-caryophyllen</b>                     | <b>13,85</b> |
| 18        | 1H-cycloprop(E)azulen, decahydo 1,1,7-trimethy-4 methylen   | 0,79         |
| 19        | garmacren D   | 1,25         |
| 20        | 8-isopropenyl 1,5 dimethyl-cyclodeca-1,5 dien               | 0,72         |
| 21        | garmacren B   | 2,12         |
| 22        | cyclohexen, 1-methyl-4-(5-methyl), 1-methylen-4-hexenyl     | 4,54         |
| 23        | naphthalen, 1,2,3,4,4a,5,6,8a, octahydro-7methyl-4-methylen | 0,55         |
| <b>24</b> | <b><math>\beta</math>-sesquiphellandren</b>                 | <b>15,12</b> |
| 25        | naphthalen 1,2,3,4,4a,7 hexahydro-1,6 - dimethyl            | 1,55         |
| 26        | 1,6,10-dodecatrien-3-ol                                     | 3,71         |
| 27        | $\gamma$ -elemen  | 2,26         |
| 28        | (-)-spathulenol   | 0,98         |
| 29        | eudesma-4-(14),11-dien                                      | 3,88         |
| 30        | naphthalen, decahydro-4a-methyl                             | 1,36         |
| 31        | tricyclo (6.3.0.1) (2.3) undec-7-en, 6,10,4-tetra-methyl    | 2,11         |
| 32        | 12-oxabicyclo[9.1.0] dodeca 3,7 dien                        | 0,92         |
| 33        | cyclohexen, 1-(1-propynyl)                                  | 1,57         |
| 34        | 1,7,7-trimethyl-2-vinylbicyclo, (2.2,1) hept-2en            | 1,98         |
| 35        | guaia -3,9 dien   | 0,27         |
| 36        | 4-(1,5 dimethylhex-4-enyl) cyclohex-2-enon                  | 0,78         |
| 37        | phytol  | 0,44         |

#### 4. Kết luận

- Hàm lượng tinh dầu từ lá và quả cây gai xanh đạt 0,2% theo nguyên liệu khô không khí.

-37 hợp chất trong tinh dầu đã được xác định, trong đó, chủ yếu là caryophyllen (17,2%), sesquiphellandren (15,1%) và  $\alpha$ -caryophyllen (13,8%).

#### Tài liệu tham khảo

1). Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam. Tập 1. Nxb. Montréal, 1991. Trang 535; 2). Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, 2000. Trang 1002-1003; 3). Trần Huy Thái. Nguồn thực vật có tinh dầu tại Ngọc Thanh, Mê Linh, Vĩnh Phúc. Tạp chí Dược học, Số 8/2001. Trang 8-10; 4). Alered Petelot. Les plantes medicinales du Cambodge, du Laos et du Vietnam. Tom I. p. 156.

### THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA TINH DẦU CÂY NHÂN TRẦN MỘC HOANG Ở ĐẮK MIL

Lê Nguyễn Lê Thu<sup>1)</sup>, Nguyễn Thị Tâm, Nguyễn Việt Thân<sup>2)</sup>, Trần Quang Thuý<sup>3)</sup>  
<sup>1)Trung Tâm Y Tế Đăk Mil, <sup>2)Trường Đại Học Dược Hà Nội, <sup>3)Viện Dinh Dưỡng Hà Nội</sup>  
(Nhận bài ngày )</sup></sup>

#### Summary

#### Oil Chemical Composition of *Adenosma caeruleum* Growing in Dak Mil

*The aerial part of Adenosma caeruleum R. Br. (Scrophulariaceae) wild growing in Đăkmil (Đăk Lăk) was collected for oil preparation. Oil analysis was carried out by a combination of capillary GC and MS. The major components of the oil are thymol (24.67%), thymyl methylether (12.59%),  $\gamma$*

*terpinene (12.26%),  $\alpha$ -humulene (16.44%),  $\beta$ -caryophyllene (5.82%),  $\beta$ -bisabolene (5.67%), p-cymene (4.58%), humulene oxide (3.59%) and caryophyllene oxide (2.76%).*

**Key words:** *Adenosma caeruleum* R. Br. Dakmil (Daklak), thymol, thymyl methylether, p-cymene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -humulene.

### Mở đầu

Nhân trần (*Adenosma caeruleum* R. Br.) họ Hoa mõm chó (Scrophulariaceae), mọc hoang thành từng vạt lớn ở vùng đồi thuộc các huyện Đăk Mil, Đăk Song thuộc tỉnh Đăk Lăk. Cây có một số điểm khác với nhân trần ở các tỉnh phía Bắc là cây thấp, cao 40-60 cm, lá vò ra có mùi thơm mạnh hơn. Nhân dân địa phương vẫn thu hái cả cây để làm thuốc chữa khó tiêu, bệnh gan và bán cho các cửa hiệu thuốc nam.

### Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

**Nguyên liệu:** Phần trên mặt đất của cây nhân trần mọc hoang ở Đăk Mil, được thu hái vào tháng 7/2002.

### Phương pháp nghiên cứu:

Hàm lượng tinh dầu (tính theo trọng lượng khô tuyệt đối) được xác định bằng phương pháp cất kéo hơi nước với dụng cụ định lượng tinh dầu cải tiến của Bộ môn Dược liệu, Trường Đại Học Dược Hà Nội.

Thành phần tinh dầu được xác định bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp khối phổ (GC/MS). Điều kiện tiến hành: Máy SKK GC-17A, cột capillar SPB5, Detector GCMS-QP 5050A, khí mang He, nhiệt độ 60-200 °C (tốc độ tăng nhiệt độ 4°C/min.), nhiệt độ buồng tiêm 250°C, nhiệt độ detector 280°C.

### Kết quả và thảo luận

Phần trên mặt đất của cây nhân trần Đăk Mil chứa 0,5% tinh dầu. Thành phần tinh dầu gồm 38 chất, trong đó chủ yếu là thymol (24,67%), thymyl methylether (12,59%),  $\gamma$ -terpinen (12,26%),  $\alpha$ -humulen (16,44%),  $\beta$ -caryophyllen (5,82%),  $\beta$ -bisabolen (5,67%), p-cymen (4,58%), humulen oxid (3,59%) và caryophyllen oxid (2,76%). Các dẫn chất nhân thơm chiếm khoảng 45%, các dẫn chất sesquiterpen 35%, còn lại là các dẫn chất monoterpen. Không có 1,8-cineol trong tinh dầu (xem bảng).

| ST T | Thành phần                          | HL %         | ST T | Thành phần                             | HL %         | ST T | Thành phần                          | HL %        |
|------|-------------------------------------|--------------|------|--|--------------|------|-------------------------------------|-------------|
| 1    | $\alpha$ -Pinene                    | 0,04         | 14   | cis-Jasmon lacton                      | 0,04         | 27   | Juniperen                           | 0,04        |
| 2    | $\delta$ -3-Caren                   | 0,40         | 15   | Nerol                                  | 0,13         | 28   | Patchoulen                          | 0,17        |
| 3    | $\alpha$ -Terpinen                  | 0,72         | 16   | Neryl acetat                           | 0,29         | 29   | Alloaromadendren                    | 2,41        |
| 4    | <b>p-Cymen</b>                      | <b>4,58</b>  | 17   | <b>Safrol</b>                          | <b>2,75</b>  | 30   | $\beta$ -Selina                     | 0,29        |
| 5    | l-Limonen                           | 0,87         | 18   | <b>Carvacrol</b>                       | 0,48         | 31   | <b><math>\beta</math>-Bisabolen</b> | <b>5,67</b> |
| 6    | trans- $\beta$ -Ocimen              | 0,06         | 19   | <b>Thymol</b>                          | <b>24,61</b> | 32   | $\alpha$ -Cedrol                    | 0,32        |
| 7    | <b><math>\gamma</math>-Terpinen</b> | <b>12,26</b> | 20   | 6-Methyl- $\gamma$ -ionon              | 0,04         | 33   | trans-Isoelemicin                   | 0,59        |
| 8    | Sabinen hydrat (cis)                | 0,02         | 21   | 1,6-)ctadien-2,5-dimethyl              | 0,13         | 34   | <b>Caryophyllen oxid</b>            | <b>2,76</b> |
| 9    | $\alpha$ -Terpinolen                | 0,06         | 22   | Aromadendren                           | 0,29         | 35   | <b>Humulen oxid</b>                 | <b>3,59</b> |
| 10   | Linalol                             | 0,18         | 23   | Eugenol methylether                    | <b>2,75</b>  | 36   | Spathulenol                         | 0,71        |
| 11   | Terpinen-4-ol                       | 0,60         | 24   | <b><math>\beta</math>-Caryophyllen</b> | 0,48         | 37   | Veridiflorol                        | 0,32        |
| 12   | $\alpha$ -Terpineol                 | 0,14         | 25   | Nerolidol                              | <b>24,61</b> | 38   | Globulol                            | 0,43        |
| 13   | <b>Thymyl methylether</b>           | <b>12,59</b> | 26   | <b><math>\alpha</math>-Humulen</b>     | <b>16,44</b> |      |                                     |             |

Những kết quả nghiên cứu trên đây chỉ có tính chất thông báo để có thể qua thành phần tinh dầu mà phân biệt giữa các loại nhân trần với nhau hoặc với bồ bồ.

### Tài liệu tham khảo

- Đỗ Tất Lợi, 1999, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB KH&KT; 2). Tang, W., G. Eisenbrand, 1992, Chinese drugs of plant origin, Springer Verlag.