

Nghiên cứu ảnh hưởng của các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) lên hoạt tính của enzym peroxidase trong máu người

Phan Minh Giang¹, Trần Thị Quỳnh Hoa^{1,2}, Phan Tổng Sơn¹

¹ Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đặt vấn đề

Kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) là loài cây thân gỗ cao từ 8-10 m. Nhân dân một số địa phương dùng vỏ cây này để điều trị lỵ và tiêu chảy^[1]. Trong điều trị lâm sàng nước sắc kháo nhậm đã được dùng để điều trị hiệu quả viêm đại tràng, viêm loét cổ tử cung và viêm tai giữa. Từ tannin kháo nhậm và formaldehyd Đặng Hạnh Khôi và cộng sự đã điều chế viên tanoform để điều trị bệnh nhân viêm đại tràng^[1]. Nghiên cứu hoá học của chúng tôi đã phát hiện được 2 hợp chất phytosterol (**11** và **12**), một sterol glucosid (**13**) và 10 hợp chất lignan và neolignan (**1-10**) từ vỏ cây kháo nhậm (**Hình 1**)^[2-4]. Trên cơ sở sự hiểu biết về các hợp chất thành phần này các hoạt tính sinh học của cây kháo nhậm có thể được nghiên cứu trong một mối tương quan với thành phần hoá học. Các lignan được hình thành trong thiên nhiên thông qua sự dime hoá hai đơn vị phenylpropanoid và một số hợp chất có cấu trúc lignan đã chứng tỏ là có các hoạt tính chống khối u, chống viêm và chống oxi hoá^[5]. Mặt khác sự gây ung thư đã được làm sáng tỏ là một quá trình nhiều bước trong đó giai đoạn xúc tiến có liên hệ chặt chẽ đến sự hư hại mô bị viêm và mô bị oxi hoá. Trong các thí nghiệm đã được thực hiện các tiểu phần oxy hoạt động gây ra các stress oxi hoá có liên quan đến sự xúc tiến khối u trong da chuột và các mô khác. Khi các chất hoạt hoá khối u được áp dụng cục bộ vào da chuột đã xảy ra sự sản sinh H₂O₂ trong biểu bì, điều này tương quan với khả năng xúc

tiến khối u của các chất này^[6, 7]. Điều này cho thấy các chất có hoạt tính chống oxi hoá mạnh có thể thể hiện tác dụng ngăn chặn sự gây ung thư, đặc biệt ở giai đoạn xúc tiến. Một số tác nhân dự phòng ung thư nguồn gốc thiên nhiên như curcumin từ *Curcuma longa* L., gingerol từ *Zingiber officinale* Roscoe và capsaicin từ *Capsicum annum* L. đều có tính chất chống oxi hoá đáng kể^[6]. Theo hướng này các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm đã được thử hoạt tính chống oxi hoá qua nghiên cứu ảnh hưởng của chúng lên hoạt tính của peroxidase trong máu người. Các peroxidase có chức năng chống oxi hoá dự phòng khi hoạt động loại bỏ các peroxid độc từ máu.

Điều kiện và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu thực vật

Vỏ cây kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) được thu thập tại Đại Từ, Thái Nguyên, vào tháng 6 năm 2000. Cây kháo nhậm đã được TS. thực vật học Nguyễn Hoàn Côi (Trung tâm Kiểm nghiệm và Nghiên cứu Dược Quân đội, Hà Nội) giám định. Mẫu được phơi khô trong bóng râm rồi được sấy khô ở nhiệt độ 50°C, rồi được nghiền thành bột mịn.

Điều chế các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm

Bột vỏ cây (2 kg) được ngâm chiết với ethanol 96% (5 l) ở nhiệt độ phòng (5 lần, mỗi lần 3 ngày). Các dịch lọc ethanol được gộp lại và được cất loại

dung môi dưới áp suất giảm ở 50°C cho đến thể tích 500 ml. Dịch chiết ethanol được hoà với nước cất theo tỷ lệ 1:1 (v/v) và dịch ethanol-nước được chiết lần lượt với các dung môi n-hexan, ethyl acetat và n-butanol. Sau khi cất loại dung môi thu được các phần chiết n-hexan (kỳ hiệu: **MOB1**, khối lượng: 82,2 g), ethyl acetat (**MOB2**, 246,9 g) và n-butanol (**MOB3**, 5,1 g).

Khảo sát định tính các lớp chất hoá học có trong các phần chiết

Các lớp hợp chất thiên nhiên xuất hiện trong các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm được phát hiện bằng các phản ứng hoá học đặc trưng [8].

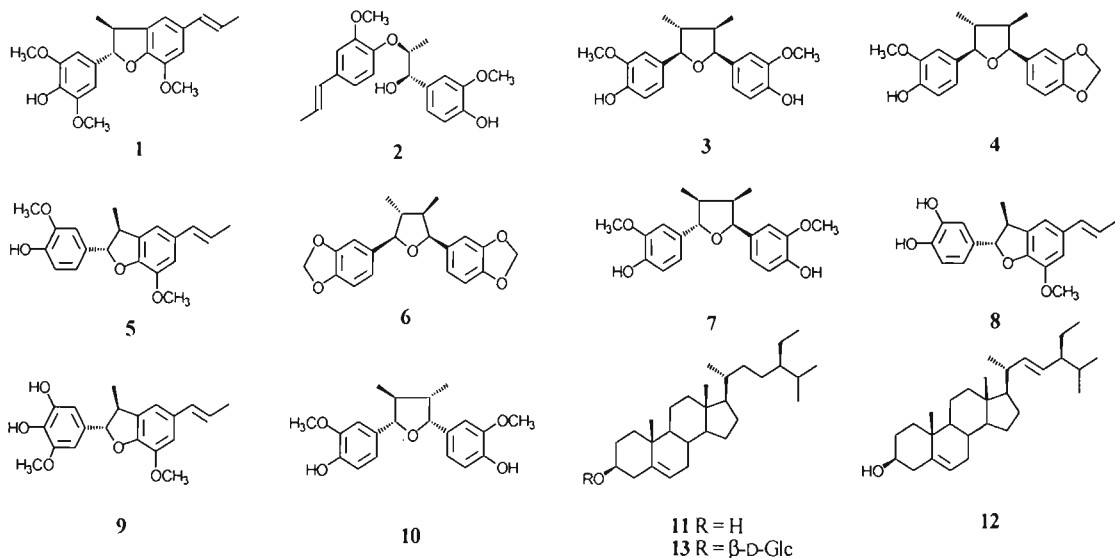
Nghiên cứu ảnh hưởng của các phần chiết lên hoạt tính xúc tác của peroxidase trong máu người

Phương pháp xác định hoạt tính xúc tác của peroxidase trong máu người dựa trên tốc độ của phản ứng oxi hoá indigocarmine bằng H₂O₂ trong môi trường acid yếu dưới ảnh hưởng của peroxidase trong máu người khi không có (mẫu đối chứng) và khi có mặt mẫu thử (các phần chiết **MOB1**, **MOB2** và **MOB3**) ở các nồng độ tăng dần (phương pháp theo Savron [9]). Hoạt tính xúc tác của peroxidase là thời gian cần thiết để oxi hoá indigocarmine và được thể hiện bằng % so với mẫu đối chứng. Thí nghiệm được tiến hành trên 3 nhóm máu người A, B và O. Phương pháp thử được tiến hành như đã được mô tả chi tiết trong [10].

Kết quả và thảo luận

Các kết quả khảo sát định tính được nêu

Hình 1: Các hợp chất được phân lập từ vỏ cây kháo nhậm



trong **Bảng 1** có thể cho thấy sự có mặt của các sterol và lignan trong phần chiết n-hexan (**MOB1**). Các kết quả này hoàn toàn phù hợp với sự phân lập các lignan và neolignan, odoratisol A (1), odoratisol B (2), odoratisol C (3), odoratisol D (4), (-)-licarin A (5), (*rel* 7*R*,8*R*,7'*S*,8'*R*)-3,4:3',4'-bis(methylenedioxy)-7,7'-epoxylignan (6), machilin-I (7), kachirachirol B (8), obovatifol (9), verrucosin (10); β-sitosterol (11) và stigmasterol (12) từ phần chiết n-hexan (**MOB1**). Các flavonoid và polyphenol đã được phát hiện trong các phần chiết ethyl acetat (**MOB2**) và n-BuOH (**MOB3**); trước đó β-sitosterol 3-O-β-D-glucopyranosid (13) đã được phân lập từ **MOB2**.

Bảng 1: Khảo sát định tính các lớp chất có trong các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm

TT	Phần chiết	Hiệu suất chiết ^{a)}	Lớp chất	Phản ứng định tính	Kết quả
1	MOB1	4,1%	Sterol	Liebermann-Burchardt	++
			Lignan	Balduin	+++
2	MOB2	12,1%	Flavonoid Polyphenol	NaOH	+
				Shinoda	++
				Diazo	++
				FeCl ₃	+++
3	MOB3	0,3%	Flavonoid Polyphenol	NaOH	++
				Shinoda	+++
				Diazo	+++
				FeCl ₃	++

^{a)} tính theo khối lượng nguyên liệu khô ban đầu

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm lên hoạt tính xúc tác của peroxidase trong 3 nhóm máu người A, B và O được nêu trong **Bảng 2**. Peroxidase có thể xúc tác cho phản ứng oxi hoá bằng H₂O₂ đối với các hợp chất chống oxi hoá trong các phần chiết và tác dụng chống oxi hoá có thể được đánh giá qua ảnh hưởng cạnh tranh với phản ứng oxi hoá indigocarmin. Hoạt tính xúc tác của peroxidase trong phản ứng oxi hoá bằng H₂O₂ được biểu diễn theo thời gian cần thiết để làm mất màu indigocarmin. Các phần chiết **MOB1**, **MOB2** và **MOB3** đã được chứng tỏ có tác dụng tăng hoạt tính của các peroxidase nội sinh trong máu người,

qua đó giảm lượng peroxid ở các giai đoạn sớm nhất và ngăn chặn sự oxi hoá xảy ra ngay sau đó. Tác dụng chống oxi hoá này có thể tăng theo nồng độ mẫu thử và chọn lọc đối với từng nhóm máu. Hoạt tính của peroxidase trong máu người biến đổi nói chung theo thứ tự O > A > B đối với **MOB1**, B > O > A đối với **MOB2** và A > B > O đối với **MOB3**. Các tác dụng này hoàn toàn có cơ sở liên quan đến các hợp chất thành phần chính như các lignan và neolignan trong **MOB1** và các hợp chất flavonoid và polyphenol trong **MOB2** và **MOB3**; các hợp chất này có thể có các cấu trúc thích hợp cho hoạt tính chống oxi hoá.

Bảng 2: Ảnh hưởng của các phần chiết lên hoạt tính xúc tác của peroxidase trong máu người

Nhóm máu	Phần chiết	Hoạt tính xúc tác của peroxidase ^{b)} (% so với mẫu đối chứng)						
		0% (đối chứng)	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml
A	MOB1	100% ứng với 41 ± 1,8 giây ^{a)}	29,3	58,5	66,1	75,3	80,0	-
	MOB2		24,5	36,9	67,4	78,2	83,3	91,9
	MOB3		22,4	65,2	80,0	82,1	86,2	-
B	MOB1	100% ứng với 34 ± 1,5 giây	7,7	25,0	60,0	69,9	76,6	-
	MOB2		41,7	55,1	75,6	80,8	88,0	94,2
	MOB3		36,0	53,5	65,5	81,4	88,0	-
O	MOB1	100% ứng với 38 ± 1,5 giây	51,3	66,3	76,6	82,5	86,4	90,3
	MOB2		14,6	43,0	70,5	78,5	81,0	86,6
	MOB3		23,6	50,8	58,9	71,7	80,3	-

^{a)} Thời gian để oxi hoá hết indigocarmin (t₂ và t₁: khi có và không có mẫu thử)

^{b)} Tính bằng $100 \times (t_2 - t_1) / t_2$

^{c)} - . không làm mất màu indigocarmin

Kết luận

1. Nghiên cứu đã xây dựng được một qui trình chiết để điều chế phần chiết n-hexan (**MOB1**) chứa chủ yếu các lignan và neolignan và các phần chiết ethyl acetat (**MOB2**) và n-butanol (**MOB3**) chứa flavonoid và polyphenol từ vỏ cây kháo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) với hiệu suất lần lượt là 4,1%, 12,1% và 0,3% so với lượng nguyên liệu khô.

2. Các phần chiết từ vỏ cây kháo nhậm thể hiện hoạt tính chống oxi hoá theo cơ chế làm tăng hoạt tính xúc tác của peroxidase trong máu người cho phản ứng oxi hoá bằng H₂O₂. Tác dụng này có thể tăng theo nồng độ mẫu thử và chọn lọc đối với từng nhóm máu.

Summary

An extraction procedure for obtaining lignan-, neolignan-containing n-hexane-soluble fractions

and flavonoid-, polyphenol-containing ethyl-acetate- and n-butanol-soluble fractions from the dried barks of *Machilus odoratissima* Nees (Lauraceae) was developed. The extraction yields (based on dry material) were 4.1%; 12.1%; and 0.3%, respectively. All of the three fractions were demonstrated antioxidative activity by increasing the activity of the human blood peroxidases. Their peroxidase activity was found dose-dependent and selective to the human blood group.

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ của Chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực khoa học tự nhiên, Đề tài đặc biệt Đại học Quốc gia Hà Nội (QG-08-05) và IFS (Stockholm).

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đức Minh, Thuốc chữa bệnh nhiễm khuẩn từ cây cỏ trong nước, Nhà xuất bản Y học, TP. Hồ Chí Minh (1995), 105-109.

(Xem tiếp trang 45)

isoprocab and fenobucarb were determined by reversed-phase HPLC with fluorescence detector after post-column derivatization. The separation of carbamates was performed on a C8 column with a gradient programmed mobile phase between acetonitrile and water. The extraction procedure was based on acetonitrile-water partition and SPE carbon-based cleanup. Average recoveries of carbamates at residue levels were in the range of 92.78% - 102.39% with relative standard deviation of 1.73 - 7.09%. The limit of detection and quantification of carbamates ranged at 6 - 10 ppb and 10 - 16 ppb, respectively.

Tài liệu tham khảo

- 1 World Health Organization, Carbamate Pesticides: A General Introduction, *Environmental Health Criteria* (1986) 64, 6-7
2. Masaru Kawasaki, Tsuyoshi Inoue, Katsuharu Fukuhara, Sadao Uchiyama, Study on GC/MS (SIM) for determination of carbamate and organitrogen pesticides in foods with simple clean-up by SPE method. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* (1999) Vol 40. No.5, 382-387.
3. Chinese National Bureau standard (1999), Method test for pesticide residues in food. CNS 13570-2, 1-10.
4. U.S. Environmental Protection Agency, Measurement

of N-methyl carbamoyloximes and N-methyl carbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post-column derivatization, *EPA method* (1995) 531.1, 1-23.

5. Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Quyết định số 49/2008/QĐ-BYT ngày 27 tháng 3 năm 2008, Danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng, hạn chế sử dụng, cấm sử dụng ở Việt Nam, 1-266.

6. Bộ Y tế, Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 02 năm 2007, Giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm, Phụ lục 5, 77-106.

7. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Guide to Pesticides Tolerances on Crops in Taiwan, (1997) 17-30.

8. AOAC International, Peer- Verified methods program: Manual on policies and procedures, Arlington Va, USA, (1993) 926-940.

9. Jack Cazes (2004), Encyclopedia of Chromatography: Validation of HPLC Instrumentation, 344-345.

10. The United States Pharmacopoeia XXIX (2006), CD ROM.

11. Hokanson G. C., A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I: The initial validation process, *Pharm. Tech* (1994), 118-130.

12. Prichard E., Mackay G. M., Points J. (1996), Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results, 6.

Nghiên cứu... (Tiếp trang 20)

2. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, Phytochemical study on *Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae, *Tạp chí Hoá học* (2003), 40, 189-192.

3. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Matsunami K., Otsuka H., New neolignans and lignans from Vietnamese medicinal plant *Machilus odoratissima* Nees, *Chem. Pharm. Bull.* (2006), 54, 380-383.

4. Phan Minh Giang, Đỗ Thị Việt Hương, Phan Tổng Sơn, Xác định (-)-licarin A từ cây Khảo nhậm (*Machilus odoratissima* Nees, Lauraceae) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tuyển tập các công trình Hội nghị Khoa học và Công nghệ Hoá học hữu cơ toàn quốc lần thứ tư*, Hà Nội (2007), 334-339.

5. Slanina J., Glatz Z., Separation procedures applicable to lignan analysis, *J. Chromatog. B* (2004), 821, 215-229.

6. Surh Y J., Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review, *Food and Chemical Toxicology* (2002), 40, 1091-1097.

7. Nakamura Y., Murakami A., Ohigashi H., Search for naturally-occurring antioxidative chemopreventors on the basis of the involvement of leukocyte-derived reactive oxygen species in carcinogenesis, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (2000), 1, 115-120.

8. Cannell R. J. P., Natural Products Isolation, *Humana Press*(1998), New Jersey

9. Савронь Е. С., Воронянский В. И., Киселев Г. И., Чечеткин А. В., Докторович Н. Л., *Практикум по Биохимии Животных*, Высшая школа, Москва (1967), 161.

10. Phan Minh Giang, Hà Việt Bảo, Phan Tổng Sơn, Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hoá và khảo sát sơ bộ tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm của các phần chiết giàu flavonoid từ lá Xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., *Tạp chí Dược học* (2005), 45, 9-12.