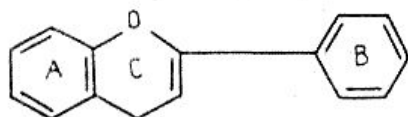


NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN FLAVONOIT LÁ
Clorodendron frangrans Vent VÀ ẢNH HƯỞNG
CỦA CHÚNG LÊN HOẠT TÍNH CATHEPSIN
Ở HUYẾT THANH MÁU NGƯỜI (*IN VITRO*)

Lê Đức Ngọc và Hà Việt Hải
Khoa Hóa, đại học Tổng hợp Hà Nội
Đào Kim Nhung
Khoa Sinh, đại học Tổng hợp Hà Nội

Flavonoit là một nhóm trong các chất polyphenol tự nhiên, có giá trị thực tiễn vì chúng có nhiều tác dụng sinh học quan trọng và ít độc. Khung cacbon của flavonoit gồm hai vòng benzen (vòng A và B), một vòng pyran (vòng C) trong đó vòng A kết hợp với vòng C tạo thành khung Chroman. Tùy theo mức độ oxy hóa khung cacbon và sự có mặt các nhóm thế mà phân loại flavonoit thành các phân nhóm sau: Flavon, Flavonol, Flavanonol, Flavanon, Chalcon, Auron, Catechin, Leucoathoxyanidin và Anthoxyanidin. Ngoài ra còn có các chất Izoflavonoit.



Khung cacbon của flavonoit

Hoạt tính sinh học của mỗi chất flavonoit phụ thuộc vào đặc điểm cấu tạo hóa học của chất đó. Vì vậy, các chất flavonoit rất đa dạng về hoạt tính sinh học và tác dụng dược lý.

Trong số các tác dụng dược lý đã biết, nhiều nhà sinh y học thế giới đặc biệt quan tâm đến hiệu lực chống khối u, chống di căn ung thư, chống quá trình lão hóa và chống viêm của một số flavonoit. Theo các tác giả M. Volf và K. Ransberger (1972) cho biết các enzym proteolytic thủy phân protit của máu có vai trò trực tiếp trong cơ chế chống di căn ung thư và quá trình lão hóa. Khả năng này phụ thuộc vào hoạt tính của enzym, đặc biệt là hệ enzym cathepsin. Các cathepsin này hoạt động tối ưu ở pH 4,5 - 5,5, khu trú chủ yếu trong lizoxom của bạch cầu đa nhân và đóng vai trò quan trọng trong cơ chế tổng quát sự thực bào.

Thăm dò ảnh hưởng của các chất flavonoit chiết suất từ thực vật đối với hoạt động enzym proteolytic máu, chủ yếu là cathepsin sẽ phần nào giúp cho việc tìm kiếm các flavonoit có hoạt tính sinh học phục vụ mục đích nói trên.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Đối tượng

1. Lá cây *Clorodendron frangrans* Vent

Tên dân gian: Cây Bạch đồng nữ, cây Bần trắng

Cây mọc hoang ở nhiều nơi, thuộc các nước Đông Nam Á. Theo Đỗ Tất Lợi (1977), thành phần hóa học của cây này hầu như chưa được nghiên cứu. Trong nhân dân cây thuốc được dùng chủ yếu chữa bệnh bạch đới ở phụ nữ. Theo những điều tra mới nhất, một số dân tộc vùng cao đã sử dụng cây này để chữa nhiều bệnh nan giải, trong đó có bệnh gan-mật, xơ cứng mạch máu, cao huyết áp, giảm đau, ung thư cổ tử cung.

2. Máu

Huyết thanh máu người bình thường, lấy ở hai lứa tuổi

I - Từ 25 đến 35 tuổi

II - từ 35 đến 45 tuổi

B. Phương pháp

1. Phát hiện flavonoid bằng các phản ứng định tính đặc trưng.

2. Chiết suất và định lượng flavonoid theo phương pháp B. C. Talli

3. Phân tích Flavonoid bằng các phương pháp:

a. Sắc ký lớp mỏng một chiều trên silicagel-G; Hệ dung môi Toluene-etyl axetat axeton-metanol (5:2:2:1).

Phát hiện sắc ký đồ trong những điều kiện cần thiết.

b. Quang phổ hấp thụ tử ngoại (QPHTTN) và hồng ngoại (QPHN).

4. Xác định hoạt tính Cathepsin huyết thanh theo phương pháp Acropxki, Arakop... (1976).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phát hiện flavonoid

Tiến hành các phản ứng định tính đặc trưng trong ống nghiệm với các thuốc thử: NaOH, muối Morth, Diazo, Shinoda với dịch chiết tổng số đều cho kết quả dương (+) chứng tỏ sự có mặt của flavonoid trong nguyên liệu nghiên cứu.

2. Chiết suất và định lượng flavonoid

Flavonoid tổng số được chiết suất bằng phương pháp B. C. Talli và cho kết quả định lượng là 0,547 0,031 (%) trọng lượng khô.

3. Phân tích flavonoid

3.1. Phân tích bằng sắc ký lớp mỏng

Tiến hành sắc ký chế phẩm flavonoid tổng số. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Dựa vào màu sắc của sắc ký đồ khi phun các thuốc thử đặc trưng chúng tôi rút ra những dự đoán sau:

- Vết 1 và 2 có thể là flavonoid thuộc nhóm flavonol.

- Vết 3 và 4 có thể là flavon.

- Các vết 5, 6, 7 là vết lạ không thuộc loại flavonoid, chúng có thể là những hợp chất trung gian của flavonoid trong các quá trình biến đổi flavonoid ở thực vật.

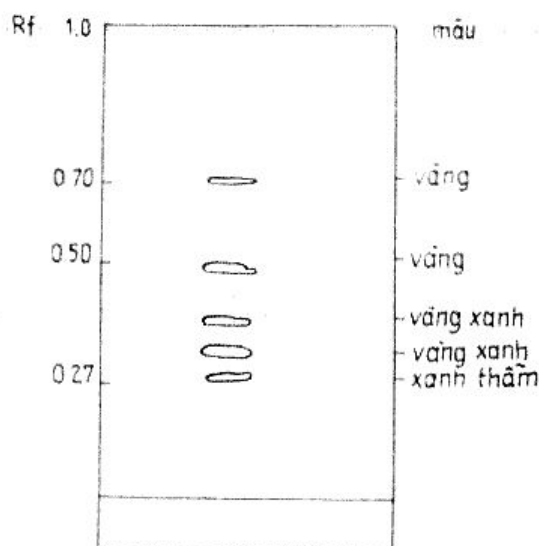
- Phản ứng với vanilin không cho màu đỏ sen trên sắc ký đồ chứng tỏ không có catechin.

Bảng 1. Kết quả phân tích flavonoid bằng SKLM (sắc ký lớp mỏng)

Số TT	Rf	UV 366nm	AlCl ₃ (UV)	Amoniac (UV)	Wilson (UV)	Iod	Ánh sáng tự nhiên
1	0,70	xanh vàng*	vàng xanh lam*	xanh lam*	vàng xanh*	nâu	vàng tươi
2	0,50	xanh vàng*	vàng xanh lam*	xanh lam*	vàng xanh*	nâu	vàng tươi
3	0,73	nâu vàng	nâu tối	nâu vàng	nâu	nâu	vàng xanh
4	0,33	nâu vàng	nâu tối	nâu vàng	nâu	nâu	vàng xanh
5	0,27	xanh lơ*	-	-	-	-	vàng thẫm
6	0,23	xanh lơ	-	xanh lơ*	-	-	-
7	0,15	đỏ nhạt	-	đỏ tím	đỏ tím	-	-

Ghi chú: Khi phun các thuốc thử lên bản mỏng sắc ký và quan sát dưới ánh sáng tự nhiên hoặc tử ngoại (UV 366 nm) xuất hiện các vết có màu đặc trưng.

Ký hiệu * vết có phát quang khi soi UV



Hình 1. Sắc ký đồ flavonoid tổng số quan sát dưới ánh sáng tự nhiên

3.2. Thu nhận chế phẩm FL-1 và những đặc trưng của nó

Phân đoạn flavonoid FL-1 được tách ra từ flavonoid tổng số bằng phương pháp sắc ký cột trên Silicagel, có các đặc điểm sau:

- Phản ứng shinoda (+)
- Trên bản mỏng sắc ký cho 1 vết duy nhất là $R_f = 0,07$, tương đương với vết số 2 trên sắc ký đồ của flavonoid tổng số.
- Các phản ứng màu đặc trưng trên bản mỏng sắc ký như sau:

Ánh sáng tự nhiên: vàng tươi

AlCl₃/UV: phát quang xanh lam

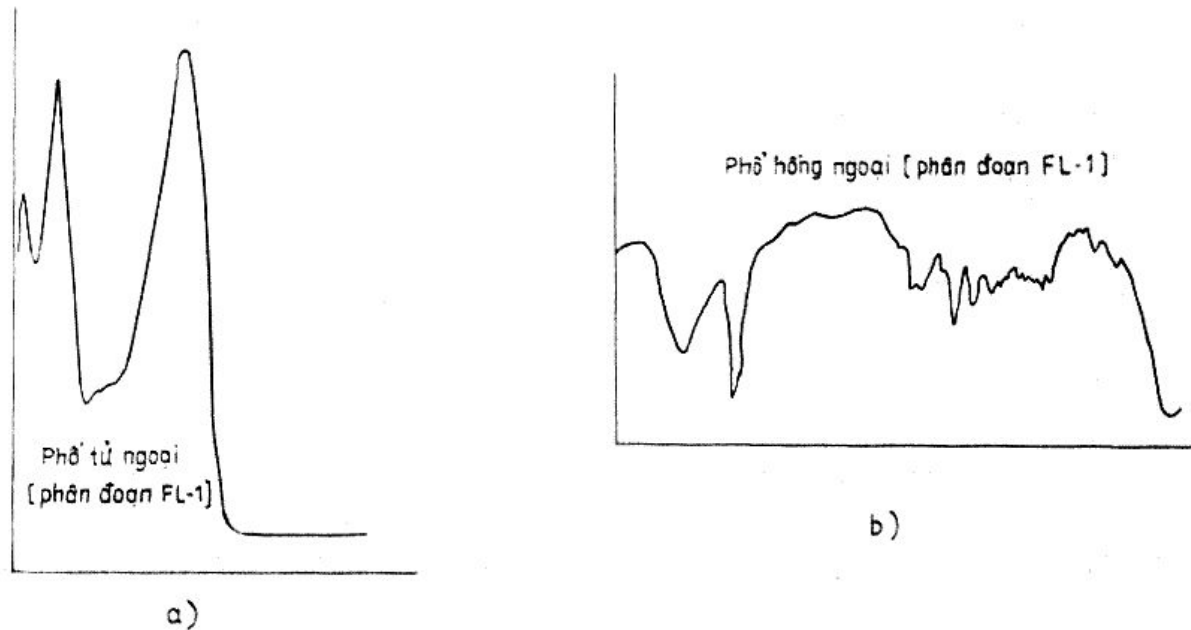
UV 366nm: phát quang xanh lam

Wilson/UV: phát quang xanh lam

H₂O₂ : chuyển từ màu vàng thành vàng nâu.

Như vậy phân đoạn FL-1 cho các phản ứng điển hình của flavonol

3.3. Phổ hồng ngoại và tử ngoại



Hình 2. Phổ tử ngoại (a) và hồng ngoại (b) của flavonoid FL-1

Từ dạng dung dịch, kết tủa flavonoid bằng chloroform và thu nhận được chế phẩm FL-1 ở dạng bột vô định hình màu vàng xanh; hòa tan bột trong metanol để đo phổ hồng ngoại và tử ngoại.

Trên phổ hồng ngoại xuất hiện các đỉnh đặc trưng sau:

- Đỉnh 1710 nm đặc trưng của nhóm C = O ở vị trí C4
- Đỉnh 3400 nm đặc trưng của nhóm OH, đỉnh rộng chứng tỏ OH ở dạng liên hợp.
- Đỉnh 1460, 1510, 1600 nm đặc trưng cho dao động hóa trị của liên kết C = C của nhân thơm.
- Đỉnh 1150nm đặc trưng cho dao động C-O-H.

Trên phổ tử ngoại xuất hiện các cực đại hấp thụ ở 370 nm và 250nm.

Như vậy dựa vào phổ hồng ngoại và tử ngoại ta thấy: trên phổ hồng ngoại xuất hiện khá đều các đỉnh đặc trưng của các dao động ứng với cấu tạo của Flavonoid. Các đỉnh cực đại hấp thụ tử ngoại nằm trong vùng cực đại hấp thụ tử ngoại của Flavonol. Vậy một lần nữa giúp ta dự đoán FL-1 là Flavonol.

4. Ảnh hưởng của Flavonoid lá *Clorodendron fragrans* Vent lên hoạt động Enzym Cathepsin huyết thanh máu người

Trong máu có nhiều loại enzym proteaza, chúng có cùng nhiệm vụ thủy phân các protit. Tuy nhiên mỗi enzym đòi hỏi một điều kiện cụ thể để thực hiện các chức năng sinh lý - sinh hóa của mình, trong đó giá trị pH là một trong những điều kiện quyết định.

Các cathepsin hoạt động ở pH = 5,5. Các enzym này là nhóm proteaza đóng vai trò quan

trọng trong cơ chế tổng quát của sự thực bào, liên quan chặt chẽ với nguyên nhân gây bệnh trong quá trình lão hóa.

Huyết thanh người khỏe mạnh được sử dụng để tiến hành thí nghiệm ở hai lứa tuổi: từ 25-35 và 35-45. Tiến hành xác định hoạt tính enzym cathepsin (thử in vitro) trong điều kiện bình thường và trong điều kiện có mặt Flavonoit tổng số và chế phẩm FL-1. Hoạt độ enzym tính theo số mM tyrosin được giải phóng sau phản ứng trên 1ml huyết thanh /1 phút.

4.1. Hoạt tính cathepsin ở huyết thanh

Kết quả ở bảng 2 cho biết giá trị hoạt tính cathepsin ở 2 lứa tuổi.

Bảng 2. Hoạt tính cathepsin ở 2 lứa tuổi khác nhau

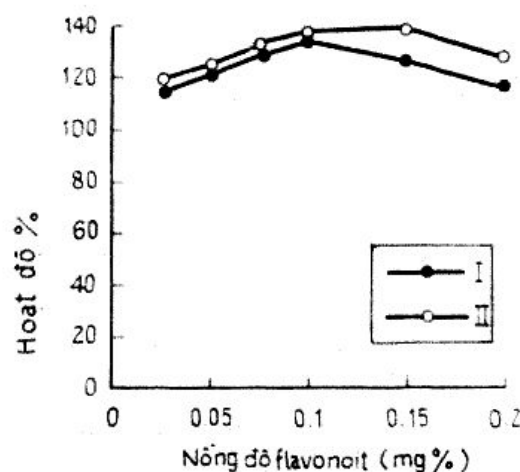
Lứa tuổi	mM Tyrosin
25 - 35 (I)	0,140 ± 0,005
35 - 45 (II)	0,110 ± 0,008

Rõ ràng hoạt tính enzym ở lứa tuổi (I) cao hơn ở lứa tuổi (II), chứng tỏ hoạt độ enzym giảm khi tuổi đời tăng (ở tuổi trung niên).

4.2. Ảnh hưởng của các chế phẩm Flavonoit (tổng số và FL-1) lên hoạt động cathepsin huyết thanh

4.2.1. Ảnh hưởng của Flavonoit tổng số

Thí nghiệm được tiến hành với các nồng độ Flavonoit biến thiên từ 0 đến 0,20 mg%. Hoạt độ enzym tăng dần và đạt giá trị cực đại đối với lứa tuổi (I) ở nồng độ 0,10 mg% (đạt 135,6%) và đối với lứa tuổi (II) ở nồng độ 0,15 mg% (đạt 139,2%). Vượt quá ngưỡng đó khả năng hoạt hóa enzym giảm dần (xem đồ thị 1).



Đồ thị 1. Ảnh hưởng của chế phẩm flavonoit tổng số lên hoạt động cathepsin huyết thanh

Nếu so sánh theo tỷ lệ % hoạt tính enzym, ta thấy rõ: Flavonoit tổng số hoạt hóa enzym ở lứa tuổi (II) mạnh hơn ở lứa tuổi (I) ở mọi nồng độ. Đỉnh hoạt động cực đại của enzym ở lứa tuổi (II) tương ứng với nồng độ Flavonoit cao hơn ở lứa tuổi (I) có nghĩa là nhu cầu Flavonoit cho sự

đạt cực đại của hoạt độ enzym ở tuổi chuyển tiếp từ thanh niên sang trung niên nhiều hơn ở lứa tuổi thanh niên.

4.2.2. Ảnh hưởng của chế phẩm FL-1 lên hoạt động cathepsin huyết thanh

Thí nghiệm tiến hành được với 4 nồng độ Flavonoit từ 0,075 đến 0,200 mg%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chế phẩm FL-1 lên hoạt động cathepsin huyết thanh

Lứa tuổi			Nồng độ flavonoit (mg%)				
			0	0,075	0,100	0,150	0,200
Hoạt độ enzym	I 25 - 35	%	100	112,5	125,4	118,9	110,2
	II 35 - 45	%	100	118,8	127,6	130,4	115,4

Kết quả trình bày trên bảng 3 cho thấy khả năng hoạt hóa enzym của chế phẩm FL-1 thấp hơn so với chế phẩm Flavonoit tổng số. Hiện tượng đó cho phép nghĩ rằng sự phối hợp giữa những thành phần Flavonoit có trong chế phẩm Flavonoit tổng số cho hiệu lực hoạt hóa enzym cao hơn từng thành phần riêng biệt.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thí nghiệm trên cho phép rút ra một vài kết luận bước đầu về Flavonoit trong lá cây *Clorodendron frangrans* Vent:

1. Thông qua các phản ứng màu đặc trưng trên sắc ký lớp mỏng và trong ống nghiệm có thể dự đoán thành phần Flavonoit trong lá cây chủ yếu là Flavon và Flavonol. Sắc ký lớp mỏng cho phép tách ra 7 vết riêng rẽ, trong đó có 4 vết thể hiện các đặc trưng của Flavonoit: vết 1 và 2 thể hiện các đặc trưng của Flavonol, vết 3 và 4 thể hiện các đặc trưng của Flavon.

2. Hàm lượng gần đúng Flavonoit tổng số là $0,547 \pm 0,031$ (%)

3. Chế phẩm FL-1 tách ra từ chế phẩm Flavonoit tổng số tương ứng với vết 1 của sắc ký đồ SKLM, sản phẩm được tách ra khá sạch, cho đầy đủ các phản ứng màu và có phổ hấp thụ tử ngoại đặc trưng của Flavonol

4. Hoạt động enzym cathepsin huyết thanh ở lứa tuổi I (25-35 tuổi) cao hơn lứa tuổi II (35 - 45 tuổi).

5. Chế phẩm Flavonoit tổng số và FL-1 đều hoạt hóa cathepsin trong huyết thanh người ở những nồng độ thích hợp, Flavonoit tổng số hoạt hóa cathepsin mạnh hơn FL-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật - Hà Nội 1977.
2. E. Stahl, Analyse chromatographique et microscopique des drogues. *Entreprise moderne d'Édition.*

Paris 1975.

3. M. D. Max Wolf, Pu. O. Karl Ransberger, *Enzyme - Therapy*, Biological Research institute. New York. Vantage press. New York Washington, Hollywood, 1972.
4. J. B. Harborne, *Biochemistry of phenolic compounds* Academic press - London and New York - 1964.
5. В. П. Георгиевский, *Физико - химические методы анализа биологически - активных веществ растительного происхождения*. Изд. "Мир" Москва 1976.

THE INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF FLAVONOIDS FROM
Clorodendron frangrans Vent LEAVES AND THEIR EFFECT ON THE
CATHEPSIN ACTIVITY IN SERUM OF MAN BLOOD (*IN VITRO*)

Le Duc Ngoc and Ha Viet Hai
Faculty of Chemistry, Hanoi University
Dao Thi Kim Nhung
Faculty of Biology, Hanoi University

The composition of flavonoids of *Clorodendron frangrans* leaves and their biological effects on the cathepsin activity in serum of man blood were studied.

The obtained results showed that the total flavonoids content was 0.547 ± 0.031 (% dry weight), the flavon and flavonol groups were the main compositions of flavonoids of *Clorodendron frangrans* leaves. The pure product FL-1, isolated from the total flavonoids possessed all characters of flavonol group. They are the special qualitative reactions, infra-red and ultra - violet spectra.

The total flavonoids and the FL-1 product in the suitable concentraions increased the cathepsin activity, but the effect of the total flavonoids was better. The enzyme activity in serum of the 25-35 years old person was higher than in that of the 35-45 years old one. The maximum enzyme activity in serum of the various ages depended on the used flavonoid concentration. The flavonoid concentration, increased the maximum enzyme activity in serum of the 35-45 age was higher than that of the 25-35 age.

Thus, it was suggested that the flavonoids of *Clorodendron frangrans* leaves have many valuable bio-pharmaceutical actions, because they increased the cathepsin activity in serum. The cathepsin activity takes a considerable role in the mechanism, concerned with the resisenace of the cancer metastasis and falling ill in the ageing.