

## MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM HOÁ - SINH HỌC CỦA FLAVONOID CALENDULA OFFICINALIS L. (ASTERACEAE)

Đào Kim Nhung, Nguyễn Thị Kim Loan  
Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

*Calendula officinalis* L. thuộc họ Cúc (Asteraceae) là cây hoa cảnh mọc ở hầu hết các nước châu Âu, được nhập vào Việt Nam từ năm 1969.

*Calendula officinalis* tên thường gọi là Souci hay Cúc Nhật Bản là loại cây dễ trồng và phát triển mạnh ở Việt Nam. Theo kinh nghiệm dân gian ở một số nước châu Âu Souci được dùng như một dược liệu để chữa nhiều bệnh viêm nhiễm khó chữa. Thành phần hoá học và hoạt tính sinh dược học của cây Souci đã được quan tâm nghiên cứu ở một số nước trên thế giới và ngày càng tỏ ra có nhiều triển vọng ứng dụng vào Y học.

Từ năm 1990, việc nghiên cứu hoa Souci đã được bắt đầu tại bộ môn Sinh hoá, Sinh học trường Đại học Tổng hợp Hà Nội. Kết quả nghiên cứu về hoa Souci trong bài báo này cho biết: Hoa Souci có hàm lượng Polyphenol cao, trong đó Flavonoid là một thành phần những hoạt chất chính, chúng có thành phần hoá học và tính sinh học rất đa dạng.

Để phục vụ việc khai thác và ứng dụng các hợp chất Flavonoid từ cây Souci, chúng tôi tiến hành nghiên cứu định lượng, định tính, xác định hoạt tính sinh học của Flavonoid ở cả hoa, lá và thân cây Souci.

### I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 1. Đối tượng.

- Hoa, lá, thân cây Souci - thu hái tại Vĩnh Tuy, Hà Nội tháng 12-1994 đem sấy tán bột và bảo quản nơi khô kín.
- Máu tươi toàn phần của người khoẻ mạnh chống đông bằng ACD - do khoa Huyết học và Truyền máu Bệnh viện Saintpaul cung cấp.

#### 2. Phương pháp

Định lượng Polyphenol tổng số theo phương pháp Folin - Denis. Chất chuẩn là Galic.

- Chiết suất và định lượng Flavonoid theo phương pháp B.C. Talli.
- Các phản ứng định tính đặc trưng của Flavonoid.
- Phân tích Flavonoid tổng số bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM), hệ môi - Toluen : Etylacetat : Aceton : Acid fomic (5:2:2:1); Bản mỏng Silicagel G.
- Đo phổ tử ngoại của Flavonoid ở  $\lambda = 200 - 400$  nm.
- Xác định tương quan trọng lượng các chất Flavonoid được tách ra trên bản sắc ký bằng phương pháp Folin - Denis với chất chuẩn là Rutin.

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### I. Định tính, định lượng Polyphenol và Flavonoid

##### 1.1. Xác định khối lượng khô của cây Souci

Sau khi thu hái 200 cây Souci tách riêng hoa, lá, thân. Dem rửa sạch, để ch nước rồi cân khối lượng tươi của mỗi loại trên cân phân tích. Mỗi mẫu cân làm

khối lượng như nhau). Sau khi phơi và sấy khô tuyệt đối (khối lượng không đổi) thu được khối lượng khô. Kết quả như sau:

Đối tượng	$\frac{\text{khối lượng khô}}{\text{khối lượng tươi}}(\%)$
Hoa	$10,84 \pm 0,22$
Lá	$7,93 \pm 0,15$
Thân	$7,37 \pm 0,3$

ết quả trên cho thấy hàm lượng nước ở thân > lá > hoa Souci.

## 2. Chiết suất, định lượng Polyphenol và Flavonoid

### 1.2.1. Định lượng Polyphenol tổng số

Chất hoạt chất từ bột nguyên liệu bằng cồn 96° trên máy Soxlet, sau đó dùng dịch chiết này để xác định hàm lượng Polyphenol tổng số theo phương pháp Folin - Denis. Kết quả như sau:

Bảng 1. Hàm lượng Polyphenol

Đối tượng	Polyphenol	
	% khối lượng khô	% khối lượng tươi
Hoa	$5,974 \pm 0,058$	$0,647 \pm 0,006$
Lá	$2,981 \pm 0,065$	$0,236 \pm 0,005$
Thân	$2,0085 \pm 0,023$	$0,148 \pm 0,002$

hàm lượng Polyphenol phân bố trong cây như sau: Hoa > lá > thân.

### 1.2.2. Chiết suất và định lượng Flavonoid tổng số:

Dịch chiết cồn của hoa, lá, thân Souci đều cho phản ứng Shinoda dương tính chứng tỏ flavonoid phân bố cả trong hoa, lá, thân Souci.

Flavonoid tổng số sau khi chiết suất được bảo quản trong cồn: dung dịch đậm đặc màu vàng hoặc vàng nâu (chế phẩm đông khô có dạng bột vô định hình màu vàng nâu).

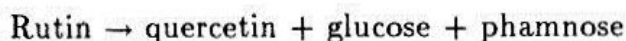
Bảng 2. Định lượng Flavonoid tổng số

Đối tượng	Hàm lượng Flavonoid		Flavonoid Polyphenol
	% khối lượng khô	% khối lượng tươi	
Hoa	$1,161 \pm 0,052$	$0,1258 \pm 0,005$	19,43
Lá	$1,195 \pm 0,054$	$0,095 \pm 0,004$	40,08
Thân	$0,5293 \pm 0,019$	$0,0367 \pm 0,002$	26,35

ết quả trên bảng 2 cho thấy: Hàm lượng Flavonoid tính theo % khối lượng khô ở lá > hoa > thân. Tỷ lệ Flavonoid tổng số so với Polyphenol tổng số cao nhất là ở lá chiếm 40,08%; thấp nhất ở hoa (19,43%). Như vậy, ngoài thành phần Flavonoid, trong đó có một tỷ lệ Polyphenol khác cao hơn ở thân và lá.

### I.3. Phân tích thành phần Flavonoid tổng số

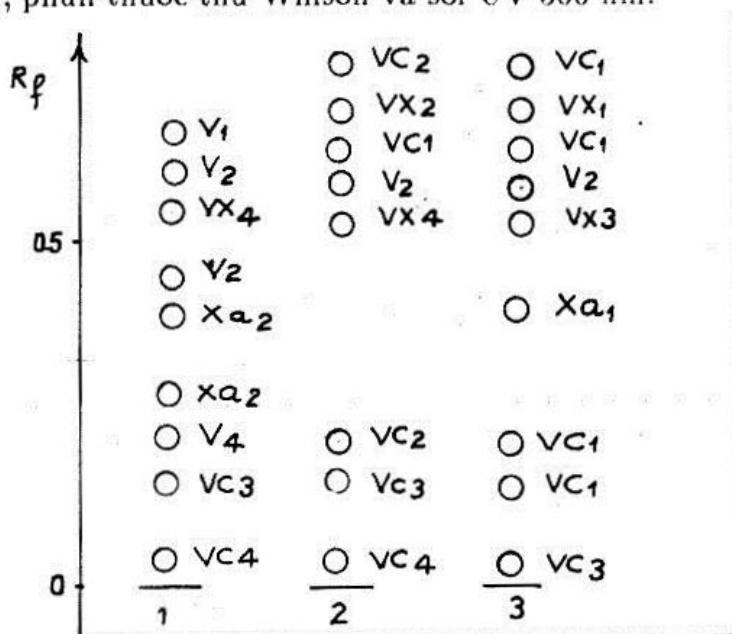
Trong cây cỏ, Flavonoid tồn tại ở cả hai dạng: dạng tự do (Aglycol) và dạng kết với đường (Glycozid). Các chất Flavonoid khi bị thủy phân bằng acit hoặc en sẽ giải phóng phân tử đường và tạo thành Aglycon. Thí dụ



Người ta chia các Aglycol của Flavonoid thành các nhóm khác nhau do mức độ hoá mạch 3 cacbon: Flavon, Flavonol, Chalcon, Auron, Flavanon, Flavanonol Catechin, Antoxyanidin, Leucoantoxyanidin, các Izoflanonoid, trong đó Flavonol là n có mức độ oxy hoá cao nhất, Catechin là nhóm có mức độ oxy hoá thấp nhất.

#### 1.3.1. Sắc ký lớp mỏng Flavonoid tổng số:

Để phân tích thành phần Flavonoid trên bản mỏng sắc ký, chúng tôi đã sử dụng nhiều phương pháp phối hợp: Quan sát sắc ký đồ dưới ánh sáng thường, nhuộm Amoniac, hơi Iod, phun thuốc thử Willson và soi UV 366 nm.



Hình 1. Sắc ký đồ (SKD) Flavonoid tổng số quan sát dưới ánh sáng thường

1. Flavonoid của hoa Souci, 2. Flavonoid của lá Souci, 3. Flavonoid của thân Souci  
Ghi chú: V: vàng; VX: vàng xanh; Xa: xám; Các chỉ số bên cạnh chỉ cường độ màu.

Trên bản mỏng sắc ký, dưới ánh sáng thường, ở hoa Souci xuất hiện 9 vết; lá Souci - 8 vết; thân - 9 vết. Các vết này đều cho màu vàng, vàng cam, vàng chanh, chứng tỏ chúng là những Flavonoid trong phân tử có hệ nối đôi liên hợp như Flavon, Flavonol, Auron, Chalcon. Khi cho qua hơi  $\text{NH}_3$ , và Iod thì màu của các vết càng đậm hơn.

Đáng chú ý là ở hoa, lá, thân Souci có nhiều vết có cùng Rf, đặc biệt là vết cuối cùng có Rf = 0,04, bằng giá trị Rf của Rutin chuẩn, chứng tỏ đây là những Glycozid.

Khi quan sát ở UV 366 nm và xử lý bằng thuốc thử Willson có một số vết phát quang màu vàng ở cả hoa, lá, thân. Các vết đó có thể là Flavon, Flavonol, chalcon ở dạng tự do hoặc liên kết nhưng trong phân tử vẫn có nhóm OH tự do ở vị trí C<sub>5</sub> Cacbonyl ở vị trí C<sub>4</sub>. Như vậy các chất này có khả năng phản ứng cao vì sự có mặt của các nhóm chức năng chủ yếu.

Kết quả phân tích Flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng được trình bày ở các bảng 3b, 3c.

Bảng 3a. Sắc ký lớp mỏng Flavonoid hoa Souci

Flavonoid			Điều kiện phát hiện				
Vết	Ký hiệu	R <sub>f</sub>	ASi	NH <sub>3</sub>	Iod	UV	Willson/UV
1	FH1	0,65	V1	V3	V4	-	-
2	FH2	0,61	V2	V3	V4	-	-
3	FH3	0,59	VX4	VXa4	V4	-	-
4	FH4	0,45	V2	V3	V4	-	-
5	FH5	0,41	Xa2	Xa2	Xa3	-	-
6	FH6	0,27	Xa2	Xa2	Xa3	V	v*
7	FH7	0,22	V4	Xa3	Xa4	-	v*
8	FH8	0,16	VC3	VX4	VX4	-	v*
9	FH9	0,04	VC4	VC4	VC4	-	v*

Bảng 3b. Sắc ký lớp mỏng Flavonoid lá Souci

Flavonoid			Điều kiện phát hiện				
Vết	Ký hiệu	R <sub>f</sub>	ASi	NH <sub>3</sub>	Iod	UV	Willson/UV
1	FL1	0,77	VC2	VC4	V4	-	V*
2	FL2	0,70	VX2	V2	V2	-	-
3	FL3	0,65	VC1	VXa2	V4	V4	-
4	FL4	0,61	V2	V2	V3	V4	-
5	FL5	0,59	VX4	VX4	V4	V4	-
6	FL6	0,22	VC2	VC3	Xa4	X3	V*
7	FL7	0,16	VC3	VC4	Xa4	X3	V*
8	FL8	0,04	VC4	VC5	VC5	XT	V*

Bảng 3c. Sắc ký lớp mỏng Flavonoid thân Souci

Flavonoid			Điều kiện phát hiện				
Vết	Ký hiệu	R <sub>f</sub>	ASi	NH <sub>3</sub>	Iod	UV	Willson/UV
1	FT1	0,77	VC1	VC2	V4	-	V*
2	FT2	0,70	VX1	VC2	V2	-	-
3	FT3	0,65	VC1	VXa2	V4	X2	-
4	FT4	0,61	V2	V2	V2	-	-
5	FT5	0,59	VX3	VX4	V3	X2	-
6	FT6	0,41	Xa1	Xa1	VXa2	-	-
7	FT7	0,22	VC1	VC2	VXa4	X2	-
8	FT8	0,16	VC1	VC2	VX4	X2	-
9	FT9	0,04	VC3	VC4	VC4	X2	V*

Ghi chú:

Màu sắc: V: vàng X: xanh VC: vàng cam  
 VXa: vàng xám Xa: xám XT: xanh tím

Các chỉ số bên cạnh chỉ cường độ màu.

(\*): Ký hiệu các vết phát quang dưới đèn tử ngoại

UV: soi đèn tử ngoại  $\lambda = 366 \text{ nm}$ .

Căn cứ vào giá trị Rf của Flavonoid trên sắc ký đồ cho phép nhận định rằng: Thành phần Flavonoid ở các bộ phận của cây Souci (hoa, lá, thân) khá giống nhau, tuy nhiên chúng vẫn có những đặc trưng riêng (xem trên SKD).

### 1.3.2. Phổ hấp thụ tử ngoại Flavonoid

Tiến hành xác định phổ tử ngoại của một số chất Flavonoid được tách ra trên sắc ký đồ của lá Souci.

Sở dĩ chúng tôi chọn lá vì các vết trên sắc ký đồ của nó rõ, nhiều vết có Rf giống hoa và thân nên có thể đại diện cho chúng.

Từ sắc ký đồ của lá Souci tách ra 6 vết để đo phổ tử ngoại. Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy các chất FL1 - FL6 đều hấp thụ ở vùng tử ngoại đặc trưng cho chất Flavonoid.

Bảng 4. Phổ tử ngoại một số chất Flavonoid trong lá Souci  
(đo liên tục từ 200 - 400 nm)

Flavonoid		Dải hấp thụ		Ghi chú
Ký hiệu	Rf	Dải 1	Dải 2	
FL1	0,77	248 - 330 (đ - 308) 330 - 384 (vai)	210 - 248 (đ - 219) 248 - 284 (đ - 272)	đ- đỉnh hấp thụ cực đại
FL2	0,70	284 - 322 (vai)	215 - 249 (vai) 249 - 284 (vai)	
FL3	0,65	280 - 322 (vai)	214 - 248 (vai) 248 - 280 (vai)	
FL5	0,59	280 - 322 (vai)	248 - 280 (vai)	
FL6	0,22	242 - 340 (đ - 274)	215 - 243 (vai)	
FL7	0,16	281 - 322 (vai)	248 - 280 (vai)	

## II. Hoạt tính sinh học của Flavonoid

Hoạt tính sinh học của Flavonoid rất đa dạng. Người ta đã nghiên cứu nó ở nhiều góc độ khác nhau. Nhưng một trong những tác dụng sinh học quan trọng của Flavonoid là khả năng kìm hãm các quá trình oxy hoá (Antioxidant) đặc biệt là quá trình oxy hoá dây truyền sinh ra bởi gốc tự do. Để đánh giá hoạt tính sinh học của Flavonoid Souci, chúng tôi đã dựa vào khả năng chống oxy hoá của các chế phẩm Flavonoid thông qua ảnh hưởng của chúng lên hoạt động enzym Peroxydaza của máu người trong phản ứng oxy hoá chất màu Indigocarmin.

Hoạt tính Peroxydaza được tính bằng thời gian phản ứng oxy hoá Indigocarmin. Thời gian càng nhanh, hoạt tính enzym càng cao và ngược lại.

Hoạt tính của Peroxydaza ở mẫu không có Flavonoid (mẫu đối chứng) là 100%. Khi có Flavonoid hoạt tính enzym sẽ thay đổi. Nồng độ Flavonoid càng cao thì hoạt tính enzym càng giảm. Thí nghiệm được tiến hành với 4 nhóm máu người: A, B, O, Kết quả cho thấy:

\* Đối với các nhóm máu khác nhau:

+ Hiệu lực kìm hãm của Flavonoid hoa Souci đối với hoạt độ Peroxydaza giảm theo thứ tự nhóm máu:

$$O > A > AB > B$$

Ở lá Souci, hiệu lực tìm hãm hoạt độ Peroxydaza của Flavonoid như sau:

$$O > A > B > AB$$

Khả năng tìm hãm hoạt độ Peroxydaza của Flavonoid thân Souci đối với các máu cũng khác nhau:

$$O > AB > B > A$$

Đối với cùng một nhóm máu: Chế phẩm Flavonoid tổng số của hoa, lá, thân Souci ảnh hưởng khác nhau đến hoạt độ Peroxydaza

- Với nhóm máu O, B, AB hiệu lực tìm hãm giảm dần theo thứ tự:

$$\text{Thân} > \text{Hoa} > \text{Lá}$$

- Với nhóm máu A, khả năng tìm hãm giảm dần:

$$\text{Hoa} > \text{thân} > \text{lá}$$

Nhìn những kết quả trên đây ta rút ra nhận xét:

- Hiệu lực tìm hãm hoạt động enzym Peroxydaza của Flavonoid hoa, lá, thân Souci ở cả ở 4 nhóm máu O, AB, B, A. Trong đó tác dụng mạnh nhất đối với Peroxydaza ở nhóm máu O.

- Sự khác nhau về hiệu lực tìm hãm enzym Peroxydaza ở 4 nhóm máu người nói lên độ mẫn cảm của Flavonoid mang tính cá thể.

- Đối với cùng một nhóm máu khả năng tìm hãm Peroxydaza của Flavonoid ở hoa, lá, thân Souci khác nhau.

Nguyên nhân của hiện tượng này phần nào được giải thích qua kết quả phân tích tính và tương quan định lượng của các chất Flavonoid trong hoa, lá, thân rất khác

Kết quả được trình bày ở các bảng 5, 6, 7.

Bảng 5. Ảnh hưởng của Flavonoid hoa Souci lên hoạt động của Peroxydaza ở bốn nhóm máu người

Nhóm máu		Nồng độ Flavonoid (mg %)											
		0	2,5		5,0		10,0		15,0		20,0		
A	Giây	10	15,33	0,33	20,30	0,33	31,30	1,85	51,30	1,33	60,00	0,57	
	% hd	100	65,27	1,38	49,20	0,79	32,12	1,80	19,50	0,50	16,66	0,16	
B	Giây	18	26,33	0,33	34,60	0,33	45,00	1,00	61,30	1,33	119,3	0,66	
	% hd	100	68,37	0,85	51,90	0,50	40,00	1,00	29,37	0,62	15,00	0,08	
O	Giây	12	21,0	0,57	27,00	1,52	47,00	1,00	121,6	1,66	0		
	% hd	100	57,22	1,57	44,71	2,41	25,55	0,50	9,86	1,33			
AB	Giây	24	36,30	0,66	47,30	0,66	70,30	1,45	104,0	0,90	127,3	1,45	
	% hd	100	66,09	1,23	50,72	0,72	34,14	0,70	23,07	0,22	18,85	0,21	

Bảng 6. Ảnh hưởng của Flavonoid lá Souci lên hoạt động của Peroxydaza ở bốn nhóm máu ng

Nhóm máu		Nồng độ Flavonoid (mg %)*									
		0	2,5		5,0		10,0		15,0		20,0
A	Giây	10	13,30	0,33	18,30	0,33	28,00	1,00	39,66	0,33	47,00
	% hd	100	75,08	1,38	54,79	0,79	35,70	1,32	25,21	0,21	21,29
B	Giây	18	28,33	0,66	36,66	0,88	44		50,66	0,66	80,00
	% hd	100	63,59	1,53	49,14	1,19	40,9		35,53	0,46	22,50
O	Giây	12	23,00	0,57	29,66	0,33	37,66	0,33	45,66	0,66	56,66
	% hd	100	47,88	1,20	37,08	0,42	29,20	0,26	24,09	0,34	19,40
AB	Giây	24	34,60	0,33	41,60	0,66	51,00	0,57	72,30	1,45	113,0
	% hd	100	66,30	0,64	55,20	0,87	45,10	0,51	31,80	0,63	20,30

Bảng 7. Ảnh hưởng của Flavonoid thân Souci lên hoạt động của Peroxydaza ở bốn nhóm máu n

Nhóm máu		Nồng độ Flavonoid (mg %)									
		0	2,5		5,0		10,0		15,0		20,0
A	Giây	10	14,00	0,57	21,30	0,45	34,00	0,57	37,00	0,57	41,00
	% hd	100	71,66	2,96	46,96	1,51	29,42	0,49	27,00	0,42	24,40
B	Giây	18	32,00		40		54,30	0,88	90		149,3
	% hd	100	56,25		45		31,14	1,51	20		12,05
O	Giây	12	23,6	0,88	56,30	0,88	133,0	1,52	600		0
	% hd	100	42,30	1,61	17,75	0,27	07,51	0,08	1,66		
AB	Giây	24	35,30	0,88	46,30	0,88	76,60	0,66	148,3	1,66	202,0
	% hd	100	65,17	1,6	49,67	0,93	30,00	0,26	15,50	0,17	11,38

### III. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Khối lượng khô tuyệt đối của cây Souci như sau:  
- Hoa: 10,84 %                      - Lá: 7,93%                      - Thân: 7,37%
2. Hàm lượng Polyphenol ở hoa, lá, thân Souci khác nhau. Trong đó hàm Polyphenol ở hoa cao nhất chiếm 5,97% khối lượng khô. Hàm lượng Polyphenol ở thấp nhất chỉ chiếm 2,0085% khối lượng khô.
3. Kết quả định lượng Flavonoid tổng số hoa, lá, thân Souci cũng khác nhau (% lượng khô):  
Hoa:  $1,161 \pm 0,052$  Lá:  $1,195 \pm 0,054$  Thân:  $0,5293 \pm 0,019$ .
4. Thành phần Flavonoid chủ yếu là Flavon, Flavonol ở dạng tự do hay dạng Gly
5. Flavonoid của cả 3 đối tượng nghiên cứu đều có khả năng kìm hãm hoạt đ Peroxydaza ở cả 4 nhóm máu người: A, B, O, AB. Trong đó nhóm máu O bị kìm mạnh nhất. Các Flavonoid của hoa và thân Souci có hiệu lực kìm hãm Peroxydaza hơn lá.
6. Có thể khai thác Flavonoid ở toàn cây Souci (hoa, lá, thân) vì chúng đều có tính Antioxydant tương đối cao.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Văn Thu. Những hợp chất Flavonoid. *Dược học số 5, Bộ Y tế*, 1978, tr. 21 -

ghiên cứu tính chất diệt khuẩn của hoa *Calendula officinalis* L (Asteraceae) và những thuốc vi lượng đồng căn của *C. officinalis* và *C. Arvensis*. *Ann, Pharm. Fr*, 1.38. No 6 (1980), 493 - 499.

avsteen B. Flavonoid a class of natural products of high pharmacology - vol.32 (7), 1983), 1141 - 48.

razyna Adler and Zofia Kasprzyk. Free Stereoes, steryl esters, glucosides, acylated ucosides and water - soluble complexes in *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, ol. 14 (1975), p. 627 - 631. Pergmont Press Printed in England.

. Vidal - Ollivter, G. Balansard. Revised structures of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*. *Journal of Natural Products* vol 52, No 5, p. 1156 - 1159. France.

ax. Wolf. M. P, Ph. D. Karl Ransberger. Enzym - Therapy. *Vantage press*. New York Washington Hollywood - 1972.

-Elias, M. De. Meo,... Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L.; *C. Arvensis* and *Hedera helix* L. *Multagenesis* vol 5, No 4 (1990), p. 327 - 331 -. Oxford University press.

elway J.W. Antiviral activity of Flavones and Flavans. *Progress in Clinical and Biological Research*, 213 (1986), p. 521 - 536.

. Vidal - Ollivier, A. Babadiamian... Identification du calenduloside F dans les fleurs de *Calendula officinalis* L. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, Tome XXII, No 4 (1988), p. 235 - 244, Paris - France.

JOURNAL OF SCIENCES. Nat. Sci., t. XII, n°3, 1996

### SOME CHEMICAL CHARACTERS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOID FROM CALENDULA OFFICINALIS L.

Dao Kim Nhung, Nguyen Thi Kim Loan

College of Natural Sciences - VNU

The composition of Flavonoids from *Calendula officinalis* L. and their biological effect (by the influence of Flavonoid on peroxydase activity in the human blood) was studied. The results showed that: - In the flower, the total Flavonoid was 1,16% DW (weight) - In the leaves, the total Flavonoid was 1,195% DW - In the stem, the total Flavonoid was 0,529% DW The main Flavonoid compositions of flower, leaves and stem are similar, they can be flavon and Flavonol. All the total flavonoid from flower, leaves and stem inhibited peroxydase, but on the different levels and it depend upon the groups of flavonoid (A, B, AB, O). FLa (7)5