

# FLAVONOID HOA CÚC BẮT TỬ (HELICHRISUM BRACTEATUM (VENT) ANDR) VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÚNG LÊN HOẠT ĐỘNG PEROXYDAZA MÁU NGƯỜI

*Đào Kim Nhung, Đinh Thị Hồng Nhung*  
*Khoa Sinh ĐHTH Hà Nội*

Cúc Bất tử thuộc họ Cúc Compositae - là loại cây cảnh, mọc ở vùng khí hậu ôn đới. ở một số nước Tây Âu, hoa Cúc Bất tử được coi như một vị thuốc dân gian sử dụng trong những bài thuốc để trị bệnh gan, mật và tăng cường tiêu hóa. Hoa Cúc Bất tử có nhiều màu sắc sỡ (vàng, đỏ, tím), có khả năng giữ nguyên hình dáng và màu sắc trong nhiều năm. Các tác giả nghiên cứu chính sắc tố trong hoa là yếu tố trị bệnh và họ đã quan tâm nghiên cứu theo hướng đó. Trước những tiền đề đã có, đề tài này nghiên cứu các chất Flavonoid (sắc tố vàng) của hoa Cúc Bất tử trồng trên cao nguyên Đà Lạt và tác dụng sinh học của chúng thông qua ảnh hưởng lên hoạt động enzym peroxydaza ở 4 nhóm máu người (A, B, AB, O).

## I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng

- . Hoa Cúc Bất tử: thu hái tại Đà Lạt 8/1993, phơi trong râm, sấy khô ở 50 - 60°C, sau đó nghiền bột và bảo quản trong túi polyetylen
- . **Máu:** Máu tươi toàn phần của người khỏe mạnh chống đông bằng ACD

### 2. Phương pháp

- . Phát hiện các nhóm chất Flavonoid bằng các phản ứng định tính đặc trưng
- . Chiết suất và định lượng Flavonoid tổng số theo phương pháp B. C. Tali (1955)
- . Thủy phân Glucoside - Flavonoid bằng HCl/100°C
- . Phân tích Flavonoid bằng:
  - + Phương pháp sắc ký lớp mỏng Silicagel G, hệ dung môi là: Toluen - etylaxetat - axeton formic (5 : 2 : 2 : 1). Phát hiện sắc ký đồ ở ánh sáng thường (AST) và ánh sáng tử ngoại với các thuốc thử đặc hiệu.
  - + Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại trên máy PYEUNICAM LTD (Cambridge)
- . Định lượng Polyphenol tổng số theo phương pháp Folin - Denis chất chuẩn là axit galic
- . Xác định Flavonoid thành phần theo phương pháp Folin - Denis chất chuẩn là Rutin
- . Xác định hoạt động Peroxydaza trong máu toàn phần theo phương pháp Xavron E. C.
- . Hoạt tính enzym được xác định bằng thời gian phản ứng oxy hóa indigocarmin. Thời gian ngừng hoạt tính enzym càng cao và ngược lại.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

#### 1. Khảo sát định tính Polyphenol và nhóm Flavonoid

Dùng dịch chiết cồn để tiến hành các phản ứng định tính đặc trưng. Kết quả trình bày trong bảng 1 đã xác nhận sự có mặt Polyphenol trong hoa Cúc Bất tử, trong đó có Flavonoid không có các chất Catechin và Antoxyan.

Bảng 1. Kết quả định tính Polyphenol và Flavonoid

Số TT	Nhóm chất	Phản ứng đặc trưng	Kết quả
1	Polyphenol	TT Morth FeCl <sub>3</sub>	+ ++++
2	Flavonoid	Shinoda NaOH	++++ ++++
3	Catechin	Vanilin/HCl	-
4	Antoxyan	Izoamylic/NaOH	-

#### 2. Định lượng Polyphenol và Flavonoid tổng số

Hàm lượng Polyphenol và Flavonoid tính theo phần trăm (%) trọng lượng nguyên liệu là: Polyphenol =  $9,13 \pm 0,21$  (%); Flavonoid =  $3,69 \pm 0,13$  (%).

Như vậy hàm lượng Polyphenol trong hoa Cúc Bất tử là khá cao, trong đó Flavonoid tỷ lệ 40,4% so với Polyphenol tổng số.

#### 3. Phân tích thành phần Flavonoid tổng số bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành sắc ký lớp mỏng chế phẩm Flavonoid tổng số trước và sau thủy phân bằng 100°C) cùng với các chất chuẩn Quercetin (aglycol) và Rutin (Glucoside)

##### 3.1. Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng chế phẩm Flavonoid tổng số

Để phân tích thành phần Flavonoid cần sử dụng nhiều phương pháp phối hợp: Quan sát ánh sáng thường (AST), nhuộm hơi NH<sub>3</sub> các vết màu vàng, vàng nâu trở nên sẫm hơn khẳng định điều nói trên.

Dưới ánh sáng thường có một vết màu vàng nâu (F<sub>5</sub>) có giá trị xấp xỉ với vết Rutin. Điều này cho phép ta dự đoán các hợp chất Glucosid có mặt trong Flavonoid tổng số của h. Bất tử có số gốc đường giao động từ 1 đến 3. Khi soi đèn tử ngoại có một số vết phát qua vết đó có thể là Flavon, Flavonol ở dạng tự do hoặc liên kết nhưng vẫn giữ nhóm OH tự trị C<sub>5</sub> và Carbonyl ở vị trí C<sub>4</sub>. Như vậy trong phân tử các Flavonoid này có những nhóm rất hoạt động

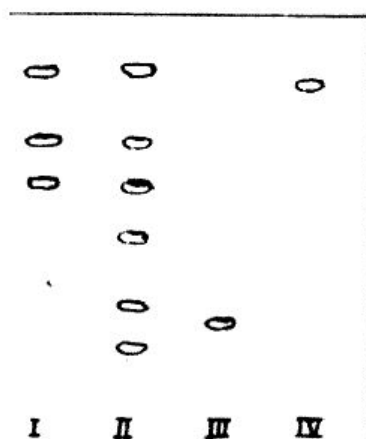
##### 3.2. Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng sản phẩm thủy phân của Flavonoid tổng số

Khi thủy phân Flavonoid tổng số bằng HCl ở 100°C trong một giờ. Các liên kết Glucosid cắt đứt, giải phóng Aglycol xuất hiện trên sắc ký đồ, các Glucoside không còn nữa.

**Bảng 2.** Phân tích thành phần Flavonoid của hoa Cúc Bất tử bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

Flavonoid		Điều kiện phát hiện			
Ký hiệu	Rf	AST	NH <sub>3</sub>	Iot	Willson/UV
F <sub>1</sub>	0,90	Vàng - 1	Vàng - 2	Xám đen - 1	Vàng lục*
F <sub>2</sub>	0,77	Vàng - 1	Xám - 1	Xám - 1	-
F <sub>3</sub>	0,67	Vàng nâu - 1	Nâu - 2	Nâu - 2	Vàng*
F <sub>4</sub>	0,52	Vàng cam - 2	Nâu - 1	Nâu - 1	Vàng*
F <sub>5</sub>	0,27	Vàng - 2	Vàng - 3	Vàng - 3	Vàng lục*
F <sub>6</sub>	0,18	Vàng nâu - 1	Nâu - 1	Nâu - 1	-

chú: - Các chỉ số bên cạnh chỉ cường độ màu; (\*) - Các vết phát quang dưới đèn tử ngoại



**(Đ1.** Sắc ký đồ Flavonoid số trước và sau thủy phân (dưới ánh sáng thường)

onoid sau thủy phân, II. Flavonoid không thủy phân (tổng số), III. Rutin chuẩn, IV. Quercelin chuẩn

Dùng dịch mẫu sau thủy phân để chạy sắc ký lớp mỏng so sánh với sắc ký đồ Flavonoid chưa thủy phân và hai Flavonoid chuẩn: Rutin, Quercelin cho phép chúng tôi có nhận định sau

Trên sắc ký đồ Flavonoid thủy phân chỉ còn 3 vết trùng hợp với F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> của sắc ký đồ Flavonoid chưa thủy phân. Như vậy Flavonoid của hoa Cúc Bất tử có 3 Aglycol trong đó F<sub>1</sub> có Rf tương đương với Rf của Quercelin

Kết quả trên sắc ký đồ chứng tỏ thành phần Aglycol tạo nên Glucoside trùng hợp với Aglycol vốn có trong Flavonoid của hoa Cúc Bất tử và sau thủy phân không thấy xuất hiện vết Aglycol mới.

### . Một số đặc điểm định tính và định lượng của các thành phần Flavonoid trong Cúc Bất tử

#### .1. Phổ hấp thụ tử ngoại Flavonoid

ừ sắc ký lớp mỏng của chế phẩm Flavonoid tổng số tách riêng từng vết để đo phổ tử ngoại. ết quả được trình bày ở bảng 3.

#### .2. Một số phản ứng định tính

iến hành phản ứng định tính với các chế phẩm F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub>. Kết quả như sau:

Phản ứng Sinoda : Các vết F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> có màu hồng và da cam với độ đậm nhạt nhau

Phản ứng với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Các vết F<sub>1</sub>, F<sub>5</sub> nhanh chóng bị oxy hóa chúng có thể là Flavonol ở Aglycol và Glucoside

Phản ứng với Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Các vết F<sub>1</sub> và F<sub>5</sub> đều có màu vàng, chứng tỏ chúng là các Flavonol. ít khác có màu đặc trưng như trình bày trên bảng 4.

Các kết quả phân tích trên đây, kết hợp với đặc điểm phổ tử ngoại cho phép dự đoán phần Flavonoid trong hoa Cúc Bất tử thuộc cả hai dạng Aglycol và Glucozit : có hệ F<sub>1</sub>, các Flavonol, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> là các Flavon và F<sub>2</sub>, F<sub>6</sub> là các Chalcon (cụ thể như ở bảng 4)

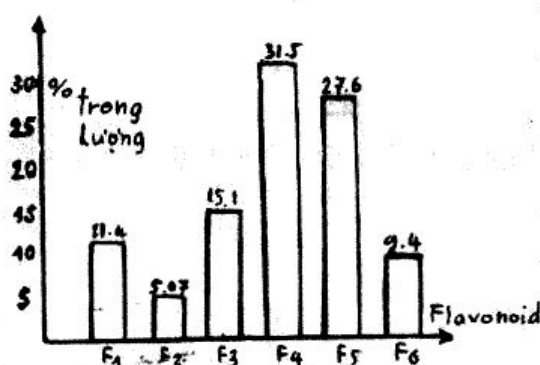
Bảng 3. Phổ tử ngoại một số chất Flavonoid trong hoa Cúc Bất tử (Đo liên tục từ 200 đến 400)

Vết	Flavonoid		Giải hấp thụ II	Giải hấp thụ I	Ghi chú
	Ký hiệu	Rf	(nm)	(nm)	
1	F <sub>1</sub>	0,90	260 - 300	350 - 380	Aglycol
2	F <sub>2</sub>	0,77	260 - 290	335 - 390	Aglycol
3	F <sub>3</sub>	0,67	250 - 290	335 - 360	Aglycol
4	F <sub>4</sub>	0,52	260 - 290	335 - 360	Glucoside
5	F <sub>5</sub>	0,27	-	355-385	Glucoside
6	F <sub>6</sub>	0,18	250 - 290	340 - 395	Glucoside

Bảng 4. Phản ứng định tính các chất Flavonoid trong hoa Cúc Bất tử

Vết	Flavonoid		Các phản ứng định tính			Dự đoán thành phần
	Ký hiệu	Rf	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Shinoda	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
1	F <sub>1</sub>	0,90	Nâu nhạt	Hồng nhạt	Vàng	Flavonol
2	F <sub>2</sub>	0,77	-	Hồng nhạt	Nâu	Chalcon
3	F <sub>3</sub>	0,67	-	Da cam nhạt	Nâu	Flavol
4	F <sub>4</sub>	0,52	-	Da cam nhạt	Cam nâu	Glucozit Flavon
5	F <sub>5</sub>	0,27	Nâu nhạt	Hồng nhạt	Vàng	Glucoside Flavon
6	F <sub>6</sub>	0,18	-	Hồng nhạt	Nâu	Glucoside Chalco

#### 4.3 Tương quan trọng lượng của các thành phần Flavonoid trong hoa Cúc Bất tử



Sau khi thu được chế phẩm Flavonoid biệt hòa tan trong cồn: F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> tiến hành định lượng Flavonoid bằng phương pháp Folin Denis với chất chuẩn là Rutin. Kết quả trình bày ở biểu đồ 1 cho thấy: hàm lượng F<sub>4</sub> cao nhất chiếm 31,5%, hàm lượng của F<sub>2</sub> thấp nhất chiếm 5,0%.

Biểu đồ 1. Tương quan trọng lượng các Flavonoid trong chế phẩm Flavonoid tổng số của hoa Cúc Bất tử

## B. Ảnh hưởng của Flavonoid lên hoạt động của Peroxydaza trong máu

### 1. Ảnh hưởng của Flavonoid tổng số

Thí nghiệm được tiến hành với 5 nồng độ Flavonoid tăng dần từ 4 đến 20 mg%. Mẫu phẩm Flavonoid tổng số của mẫu nghiên cứu đem thử trên 4 nhóm máu, thí nghiệm được 5 lần, kết quả được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của chế phẩm Flavonoid tổng số Cúc Bất tử lên hoạt động của Peroxydaza (Tính theo thời gian phản ứng bằng giây quy đổi ra %)**

Nhóm máu	N. độ Flavonoid (mg%)					
	0,0	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
A	10 <sup>n</sup> =100	20,20	5,5	UC	UC	UC
B	8 <sup>n</sup> =100	40,0	21,27	11,1	UC	UC
AB	10 <sup>n</sup> =100	31,33	22,72	16,66	4,04	UC
O	9 <sup>n</sup> =100	30,3	34,30	8,77	2,8	UC

Thi chú : UC - enzym bị ức chế hoàn toàn

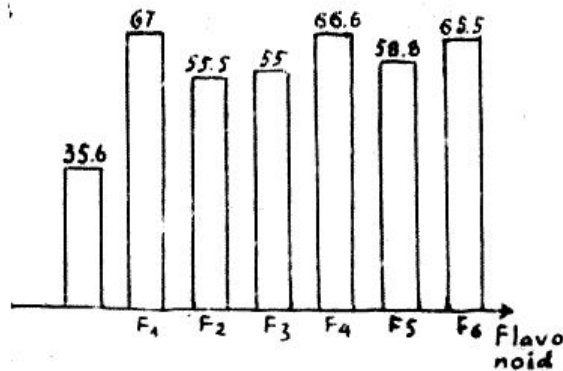
Dựa kết quả thu được, chúng tôi rút ra một số nhận xét sau:

Nồng độ Flavonoid càng cao thì hiệu lực kìm hãm Peroxydaza càng lớn và có thể bị ức chế toàn

Hiệu lực kìm hãm Peroxydaza của Flavonoid hoa Cúc Bất tử đối với từng nhóm máu thì nhau, kìm hãm mạnh nhất đối với nhóm máu A, và yếu nhất với nhóm máu AB. Hiệu lực giảm theo trình tự  $A > B > O > AB$

### 1. Ảnh hưởng riêng biệt của các thành phần Flavonoid

Với mục đích tìm hiểu hiệu lực kìm hãm Peroxydaza của từng Flavonoid riêng biệt, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các chế phẩm Flavonoid: FIS, F<sub>1</sub>; F<sub>2</sub>; F<sub>3</sub>; F<sub>4</sub>; F<sub>5</sub>; F<sub>6</sub> ở nồng độ Flavonoid là 0,08 mg% lên hoạt động của Peroxydaza nhóm máu A.



Kết quả trình bày ở biểu đồ 2 cho thấy: hiệu lực kìm hãm của các chế phẩm Flavonoid khác nhau, tuy nhiên sự chênh lệch không lớn; Điểm rõ nét nhất trên biểu đồ 2 là hiệu lực kìm hãm của Flavonoid tổng số lớn hơn tất cả các Flavonoid riêng biệt. Điều này chứng tỏ có sự phối hợp tác dụng giữa các Flavonoid thành phần

Biểu đồ 2. Ảnh hưởng riêng biệt của từng Flavonoid hoa Cúc Bất tử lên hoạt động Peroxydaza nhóm máu A. (nồng độ Flavonoid = 0,08 mg%)

Như vậy tác dụng kìm hãm phản ứng oxy hóa không chỉ phụ thuộc vào đặc điểm hóa học của Flavonoid mà còn do đặc điểm của từng cơ thể, đại diện ở đây là các nhóm máu A, B, AB, và cách khác, mỗi cơ thể tiếp nhận Flavonoid một cách có lựa chọn. Vì vậy để đạt hiệu quả oxy hóa cao nên sử dụng Flavonoid ở dạng hỗn hợp (vì có sự phối hợp tác dụng giữa một Flavonoid sẽ làm tăng hoạt tính sinh học của chúng). Điều này cũng phù hợp với nhận định của D. Gordienko (1990) là "với mục đích điều trị cần dùng hỗn hợp nhiều Flavonoid một lúc" cơ chế tác dụng của Flavonoid đối với Peroxydaza có một số tác giả đề cập đến. Song, nghiên cứu sâu sắc và cụ thể chưa có. Dựa trên đặc điểm cấu tạo phân tử và khả năng phản

ứng của Peroxydaza và Flavonoid thì một trong những cơ chế tác dụng của Flavonoid là Peroxydaza là tác dụng kìm hãm cạnh tranh.

Trên đây mới chỉ là kết quả nghiên cứu bước đầu có tính chất thăm dò và hé mở triển khai thác Flavonoid từ ba Cúc Bất tử. Song để triển vọng đó trở thành hiện thực cần tiếp tục nghiên cứu sâu sắc và toàn diện hơn.

## KẾT LUẬN

Từ kết quả trên đây cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Thu nhận chế phẩm Flavonoid dưới dạng bột vô định hình, hàm lượng Polyphenol Flavonoid là khá cao Polyphenol = 9,13%; Flavonoid = 3,69%
2. Thành phần Flavonoid có thể là Flavon, Flavonol, chalcon ở dạng Aglycol và Glucoside
3. Chế phẩm Flavonoid kìm hãm hoạt động của Peroxydaza cả 4 nhóm máu A, B, AB, O. Hiệu lực kìm hãm phụ thuộc vào nồng độ Flavonoid và đặc điểm từng nhóm máu.
4. Các Flavonoid thành phần đều có khả năng kìm hãm hoạt động của Peroxydaza. Hiệu lực kìm hãm của các chế phẩm là khác nhau và đều thấp hơn Flavonoid tổng số. Điều đó chứng tỏ chất Flavonoid của họ Cúc Bất tử đều có thể ứng dụng vào đời sống.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gordienko A. D., 193. Cơ chế bảo vệ gan của các Flavonoid — Đàm Bảo Trung dịch từ *Farmaziya* 1990; 375-78 (Nga) — Tạp chí dược học số 5, tr 27-28.
2. Harborne T. B., Biochemistry of phenolic compounds. Academic press London and New York p 9-13.
3. Grisebush H. Chemistry of Natural phenolic compounds Ed. by W. D. Olfs London 1961, p 1-13.
4. Барабой В. А. Раскительные фенолы и здоровье человека. Изд. "Наука" Москва стр. 160.

## THE INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF FLAVONOIDS FROM *HELICHRYSUM BRACTEATUM* (VENT) ANDR AND ITS INFLUENCE ON PEROXYDASE ACTIVITY OF HUMAN BLOOD

*Dao Kim Nhung, Dinh Hong Nhung*  
*Faculty of Biology, Hanoi University*

The composition of flavonoids of *Helichrysum bracteatum* flower and their biological activity expressed by the peroxidase activity of the human blood was studied. The results showed the total flavonoid content was  $3,69 \pm 0,25$  (% dry weight). The flavonoid composition mainly consisted of flavonol and chalcon. They existed in two kinds: aglycol and glucoside.

Six flavonoid compositions, isolated from the total flavonoid preparation possessed all characters of flavonoid group. They are the special qualitative reactions, ultra violet spectra.

The total flavonoid preparation, inhibited the peroxidase activity was determined. The inhibited enzyme effect was different in the blood groups (A, B, AB, O). The possibility, in the peroxidase activity of the flavonoid compositions was different.