

HÀM LƯỢNG 20-HYDROXYECDYSONE TRONG MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT VƯỜN QUỐC GIA NAM CÁT TIỀN

VŨ THỊ LOAN ⁽¹⁾, VOLODIN V.V. ⁽²⁾, VOLODINA S.O. ⁽²⁾,
PHẠM KHẮC LINH ⁽¹⁾, NGUYỄN THỊ VÂN ⁽¹⁾

1. MỞ ĐẦU

Ecdysteroids là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp chứa trong nhiều loài động, thực vật. Ở côn trùng ecdysteroids là một hormone quan trọng tham gia vào quá trình lột xác và biến thái. Trong thực vật, ecdysteroids được tổng hợp và hoạt động như một phytoalexins, bảo vệ thực vật khỏi các loài côn trùng và tuyến trùng ở đất hoặc đáp ứng lại các điều kiện bất lợi của môi trường. Ecdysteroids tham gia vào các quá trình sinh hóa và sinh lý của cây trồng, có thể ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái thực vật, như là một hợp chất hoạt động sinh lý tham gia vào kéo dài coleoptiles, kích hoạt alpha-amylase, làm chậm quá trình vàng lá [4].

Các phytoecdysteroids đầu tiên được tìm thấy trong lá cây Podocarpus nakai bởi nhà nghiên cứu Nhật Bản trong chuyến khảo sát về thực vật dân tộc ở Đài Loan năm 1966. Kết quả nghiên cứu sàng lọc các loài thực vật nhằm phát hiện ecdysteroids trên quy mô lớn do các nhà khoa học Nhật Bản tiến hành cho thấy 5,1% trên tổng số loài được phân tích (1056 loài thuộc 186 họ, 738 chi) có hoạt tính của “hormone lột xác”. Trong một nghiên cứu khác có tới 24 trên tổng số 64 loài phát hiện thấy ecdysteroid. Nghiên cứu sàng lọc có tuyển chọn 131 loài thực vật ở các vùng Uran, Kavkaz, Viễn đông (Nga) và Trung Quốc [11] cho thấy xác suất bắt gặp ecdysteroids cao – 34/131 loài chứa 20-hydroxyecdysone (20E) - hợp chất điển hình, chiếm tỷ lệ lớn nhất trong số các phytoecdysteroids [5].

Đối với động vật có vú, kể cả người, ecdysteroids không có hoạt tính hormone, độc tính thấp (LD₅₀ của 20E – 6g/kg thể trọng) tác động có lợi đến quá trình trao đổi chất, hỗ trợ duy trì glucose (giảm glucose máu) và ổn định lipid (giảm cholesterol trong máu bằng cách giảm tổng hợp cholesterol và tăng dị hóa chúng hoặc kích thích chuyển hóa cholesterol thành axit mật), có tác dụng bảo vệ gan, tăng tiết mật, tăng cường khả năng hoạt động của cơ thể trong điều kiện bất lợi [7]. Trên chuột với liều sử dụng 10mg/kg thể trọng qua đường uống, 20E có tác dụng chống tiểu đường và chống béo phì. Ngoài ra, 20E làm giảm biểu hiện của phosphoenolpyruvate carboxykinase và glucose-6-phosphate, giảm sản xuất glucose ở gan và gây ra phosphoryl hóa Akt2, tăng biểu hiện adiponectin trong mô mỡ và tăng tuần hoàn adiponectin đến khối mỡ. Ecdysteroids cải thiện tình trạng da, hoạt động như chất ức chế collagenase và đẩy nhanh quá trình chữa lành các vết thương nhỏ và vết bỏng, cải thiện hoạt động của hệ thống miễn dịch [8], có hoạt tính chống stress oxy hóa, bảo vệ chống lại quá trình peroxid hóa lipid bởi các gốc tự do ở liều lượng rất thấp - 0.1mg/kg thể trọng. Báo cáo của Xun X.N. và cộng sự cho thấy ecdysteroids còn có tác dụng chống lại các tác hại của thuốc benzodiazepine hoặc rượu.

Mặc dù có nhiều nghiên cứu ứng dụng ecdysteroids trong sinh học, y học và nông nghiệp, nhưng tại Việt Nam, hướng nghiên cứu về nhóm hoạt chất này trên thực vật chưa được quan tâm nhiều. Các báo cáo nghiên cứu về phytoecdysteroids tại Việt Nam chủ yếu tập trung khảo sát thành phần hóa học của từng loài riêng lẻ, không mang tính hệ thống, như: lá dâu (*Morus alba*), cây lược vàng (*Callisia fragrans*), bình linh cọng mảnh (*Vitex leptobotrys*), nguru tất bắc (*Achyranthes bidentata*), nguru tất nam (*Achyranthes prostrata*)... Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu sàng lọc các loài thực vật Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên (Đồng Nai) nhằm phát hiện loài chứa hàm lượng ecdysteroid cao (20E) định hướng làm nguyên liệu bào chế các chế phẩm khác nhau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Một số loài thực vật thuộc họ Amaranthaceae (chi *Amaranthus*, *Cyathula*, *Gomphrena*), Malvaceae (chi *Sida*), Meliaceae (chi *Sandaricum*), Verbenaceae (chi *Vitex*) thu thập tại Vườn quốc gia Nam Cát Tiên, tỉnh Đồng Nai (tháng 5/2016) được TSKH Kuznesov A.N. (Viện Sinh thái nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga) xác định, mẫu tiêu bản lưu giữ tại Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

2.2. Hóa chất, thiết bị

- Axetonitrin, metanol (Merk);
- Chất chuẩn 20-hydroxyecdysone (20E, 99,9%) do Viện Sinh học Komi – Liên bang Nga cung cấp;
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1200, cân phân tích, cân kỹ thuật, máy sấy, máy nghiền và các dụng cụ, thiết bị khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu và thu mẫu ngoài thực địa tiến hành theo [1]: Điều tra, thu mẫu theo tuyến, với mỗi loài đều lấy mẫu tiêu bản và mẫu phân tích. Đánh số, ghi chép và ép mẫu tiêu bản, sấy ở nhiệt độ 50°C và bảo quản mẫu trong túi polyetylen chứa silicagel phục vụ việc định danh. Mẫu thực vật để phân tích chia thành các bộ phận (thân, lá, cành, rễ, hoa...). Sấy mẫu ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi, xay nhỏ và bảo quản mẫu trong bình hút ẩm chứa silicagel.

- Phương pháp phân tích 20E trong mẫu thực vật:

- + Xử lý mẫu: Ngâm chiết 100 mg bột mẫu (cân trên cân phân tích) với 3 ml dung dịch methanol 60% ở 25°C trong 16h. Ly tâm thu dịch nổi (12000 vòng/phút, 25 phút), pha loãng 1 ml dịch nổi với 2 ml nước cất, sau đó cho dịch chiết này qua cột Diapak C₁₆ (BioChemMak, Liên bang Nga) và rửa giải bằng methanol 60%.

- + Phân tích mẫu trên máy HPLC Agilent 1200, cột Zorbax Eclipse XDB-C18 (5µm, 4,6x150 mm). Thành phần pha động: nước/axetonitrin (8:2), tốc độ dòng 1ml/phút, λ = 242 nm. Nhiệt độ cột: 30°C.

+ Công thức tính hàm lượng 20E trong mẫu phân tích:

$$C\% = \frac{9 * C}{m} \times 100$$

C%: hàm lượng 20E trong mẫu phân tích (% khối lượng chất khô);

C: hàm lượng 20E tính theo diện tích pic trên sắc ký đồ;

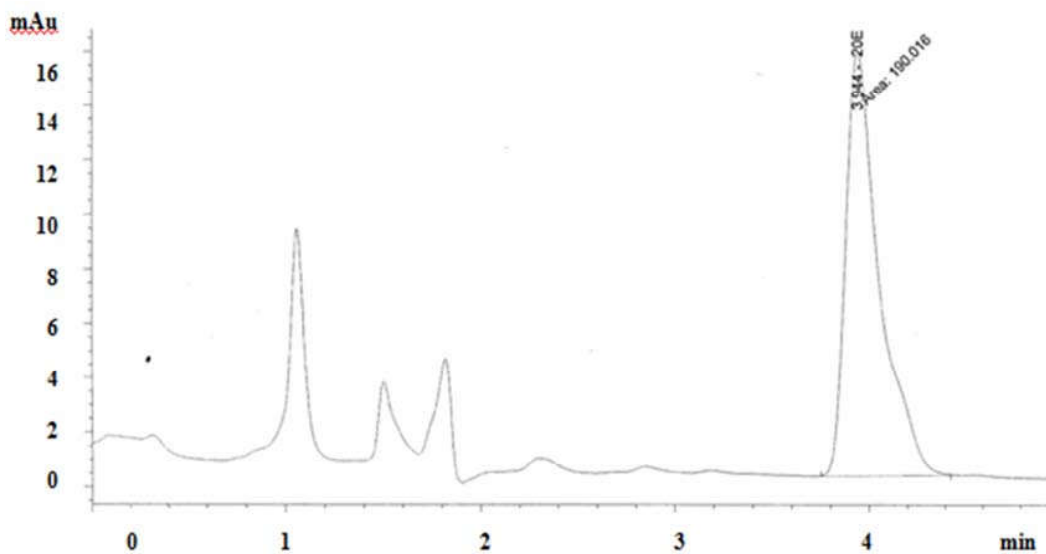
m: khối lượng bột mẫu (g).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

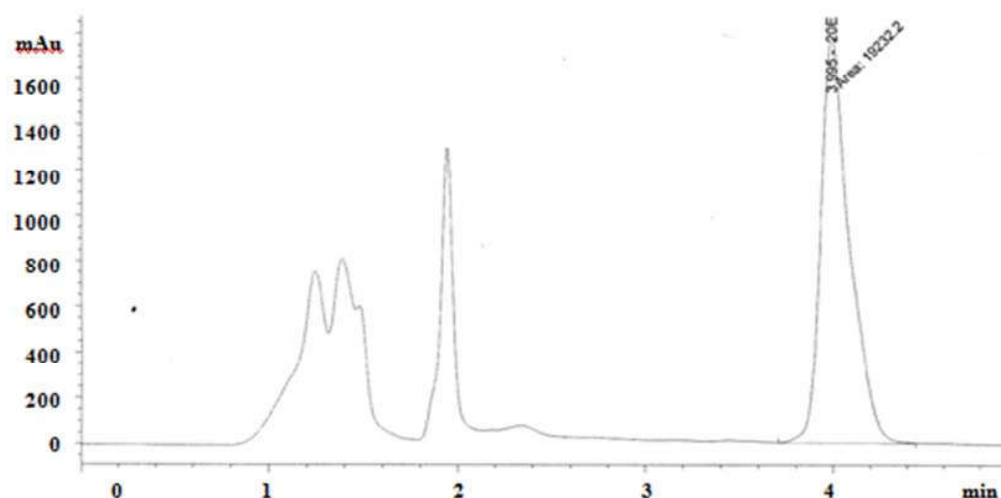
Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu sàng lọc hệ thực vật Vườn Quốc gia Cúc Phương trước đây cho thấy các loài thực vật thuộc chi *Cyathula*, *Achyranthes* (họ Amaranthaceae), *Sida* (họ Malvaceae) và *Vitex* (họ Verbenaceae) chiếm ưu thế với hàm lượng ecdysteroids được đánh giá là có triển vọng làm dược liệu [10]. Vì vậy, nghiên cứu này đã tập trung thu thập các mẫu thực vật thuộc các chi này trong chuyến khảo sát tại Vườn Quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai).

Theo báo cáo kết quả điều tra thực vật rừng khu vực Nam Cát Tiên của Phân viện Điều tra quy hoạch rừng II, chi Bình linh (*Vitex*) đứng hàng thứ 6 (2,8%) trong số các loài cây ưu thế có số lượng các thể loài trên 1%. Trong đó các loài *Vitex pierreana*, *Vitex canescens* và *Vitex negundo* var. *cannabifolia* bắt gặp khá nhiều trên các tuyến khảo sát thực vật.

Sắc ký đồ 20E của mẫu chất chuẩn và mẫu nghiên cứu được thể hiện trên hình 1 và 2. Xác nhận sự có mặt của 20E trong mẫu nghiên cứu thông qua so sánh thời gian lưu với mẫu chuẩn 20E (4 min) trên sắc ký đồ. Hàm lượng 20E trong mẫu nghiên cứu được xác định bằng cách so sánh diện tích pic với chất chuẩn và dựa vào đường chuẩn.



Hình 1. Sắc ký đồ chất chuẩn 20E



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu lá non *Vitex tripinnata*

Kết quả xác định hàm lượng 20E trong các mẫu thực vật được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng 20E trong các mẫu thực vật Vườn Quốc gia Nam Cát Tiên

Tên loài	Vị trí lấy mẫu	Bộ phận	Hàm lượng 20E, %
Họ Amaranthaceae			
Alternanthera brasiliana	Trung tâm Du lịch sinh thái và môi trường	Lá	KPH
		Cành	KPH
Cyathula prostrata	Bến đò	Phần trên mặt đất	0,05
Gomphrena celosioides	Mọc ven đường	Phần trên mặt đất	0,06
Họ Malvaceae			
Sida acuta	Trạm kiểm lâm Đăk Lua	Lá	0,55
		Cành	0,13
Sida rhombifolia	Trạm kiểm lâm Đăk Lua	Lá	0,46
		Cành	0,32
Họ Tetramelaceae			
Tetrameles nudiflora	Cây Tung 400 tuổi. 11°27'045" N, 107°21'855" E. Độ cao 176m so với mực nước biển	Vỏ	0,002
Họ Verbenaceae			
Vitex canescens	Trung tâm Du lịch sinh thái và môi trường	Vỏ	0,91

Tên loài	Vị trí lấy mẫu	Bộ phận	Hàm lượng 20E, %
<i>Vitex leptobotrys</i>	Nhà nấp, 11°25'174" N, 107°25'604" E. Độ cao 133m so với mực nước biển	Lá	0,26
		Cành	0,40
		Vỏ	0,53
		Hoa+quả	0,67
<i>Vitex canescens</i>	Chuồng gấu, 11°25'428" N, 107°25'690" E. Độ cao 144m so với mực nước biển	Lá	Vết
		Cành	0,007
		Hoa	Vết
		Vỏ	0,93
<i>Vitex canescens</i>	Trạm kiểm lâm Đà Kộ, 11°28'074" N, 107°27'633" E. Độ cao 140m so với mực nước biển	Vỏ	1,11
Tên loài	Vị trí lấy mẫu	Bộ phận	Hàm lượng 20E, %
<i>Vitex canescens</i>	Đường đi Đội 2, 11°24'356" N, 107°24'443" E. Độ cao 436m so với mực nước biển; chồi non tái sinh	Lá+ngọn	1,56
		Cành	0,87
<i>Vitex tripinnata</i>	Tuyến thực vật số 3, 11°26'494" N, 107°25'927" E. Chiều cao cây 11m	Chồi non	3,44
		Cành	0,26
		Vỏ	0,29
<i>Vitex tripinnata</i>	Đường đi trạm kiểm lâm Đăk Lua, 11°26'551" N, 107°25'949" E. Chiều cao cây 7m	Chồi non	3,42
		Cành	0,39
<i>Vitex pinnata</i>	Đường đi trạm kiểm lâm Đăk Lua, 11°26'365" N, 107°25'459" E. Độ cao 160m so với mực nước biển. Chiều cao cây 6m	Lá	KPH
		Cành	KPH
		Vỏ	0,19
<i>Vitex pinnata</i> var. <i>ptilota</i>	Tuyến sinh thái, 11°26'448" N, 107°24'917" E. Độ cao 156m so với mực nước biển. Chiều cao cây 13m	Lá	0,06
		Cành	KPH
		Vỏ	0,21

KPH: không phát hiện.

Họ Amaranthaceae: Có 23 loài thuộc 9 chi trong họ Dền chứa 20E [12]. Tại Nam Cát Tiên thu được 3 loài thực vật thân thảo thuộc họ Dền: *Cyathula prostrate*, *Alternanthera brasiliensis*, *Gomphrena celosioides*. Phần trên mặt đất của chúng không có hoặc chỉ chứa ecdysteroids hàm lượng thấp. Theo [10] trong lá *Cyathula prostrate* (pha sinh trưởng - có hoa) thu hái tại Cúc Phương chứa 0,18% 20E. Hàm lượng 20E phần trên mặt đất của *Cyathula prostrate* (pha sinh trưởng - sinh dưỡng) thu hái tại Nam Cát Tiên chỉ đạt 0,05%, ít hơn gần 4 lần. Kết quả này có thể được giải thích do thời gian thu mẫu, môi trường sống, bao gồm các yếu tố về địa lý, khí hậu và pha sinh trưởng khác nhau. Mặt khác, sự tích lũy 20E trong thực vật có thể

đạt hàm lượng cao ở giai đoạn chồi non hoặc giai đoạn sinh sản (trước hoặc trong lúc có hoa). Trong y học dân tộc của một số nước bộ phận rễ của các loài thuộc chi *Cyathula* được dùng với công dụng giống như thực vật chi *Achyranthes*, do rễ của chúng có chứa ecdysteroids. Tuy nhiên trong đợt khảo sát tại Nam Cát Tiên, số lượng cá thể thực vật chi *Cyathula* bắt gặp rất ít, không đủ mẫu rễ cho phân tích xác định hàm lượng 20E.

Họ Malvaceae: *Sida* là một chi thảo mộc quan trọng trong y học dân tộc ở nhiều quốc gia gồm khoảng 200 loài thuộc họ Malvaceae [9]. Chúng phân bố như cỏ dại nơi đất hoang ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Thành phần hóa học của thảo mộc *Sida* gồm các nhóm hoạt chất chính như alkaloids, flavonoid và ecdysteroid. Theo một số báo cáo nghiên cứu trước đây, hoạt tính “hormone biến thái” được tìm thấy trong các loài thực vật: *Sida carpinifolia*, *S. cardifolia*, *S. rhombifolia*, *S. spinosa*, *Napaea dioica*, *Urena lobate*. Lá *Sida acuta* thu hái ở Nam Cát Tiên chứa hàm lượng 20E tương đối cao (0,55%). Trong lá *S. rhombifolia* hàm lượng 20E thấp hơn (0,46%). Hàm lượng 20E trong cành của hai loài này dao động từ 0,13% đến 0,32%.

Họ Verbenaceae: Số liệu bảng 1 cho thấy ở các bộ phận khác nhau của cây sẽ có hàm lượng 20E khác nhau. Hầu hết các mẫu vỏ *Vitex* đều chứa 20E với hàm lượng dao động từ hàm lượng 0,19% đến 1,11% khối lượng khô (vỏ *Vitex canescens*). Theo nghiên cứu tài liệu, 20E được tìm thấy trong nhiều loài *Vitex*: *V. madiensis*, *V. megapotamica*, *V. pinnata*, *V. stickeri*, *V. thyrsoflora*, *V. polygama*, *V. cymosa*, *V. donania*, *V. leptobotrys* và một số loài thuộc các chi khác của họ này: chi *Callicarpa*, *Clerodendrum*. Từ vỏ thân [3] và vỏ rễ [2] *V. canescens* thu hái ở Thái Lan A. Suksamrarn cũng phân lập được 20E với hàm lượng khác nhau. Sự khác biệt này có thể được giải thích do pha sinh trưởng của cây khác nhau, địa điểm thu mẫu khác nhau, dẫn đến hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau. Hàm lượng 20E cao nhất trong lá non *Vitex tripinnata*, đạt 3,44% (hình 2). Lá non và cành non *Vitex canescens* chứa hàm lượng 20E thấp hơn, tương ứng là 1,56% và 0,87%.

Chi *Vitex* có khoảng 270 loài, phân bố khắp thế giới ở các vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới, một số loài được tìm thấy ở vùng ôn đới. *Vitex* được sử dụng trong y học dân tộc của nhiều nước Ấn Độ, Mêxico, Ayurveda, Unani, Trung Quốc, Việt Nam. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài *Vitex* cho thấy chúng có chứa nhiều hoạt chất sinh học như iridoids, flavonoid, diterpenoid, các dẫn xuất của chúng và phytosteroid, đảm nhận tác dụng dược lý khác nhau của chúng như: giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn, kháng histamine, chống oxi hóa, chống viêm gan và chống loạn nhịp [6]. Điều này cho thấy tiềm năng dược liệu của thực vật chi *Vitex* trong việc phát triển các dược phẩm mới là không thể phủ nhận.

Như vậy, 20E được phát hiện thấy trong 10 loài thực vật ở Vườn quốc gia Nam Cát Tiên. Sự phân bố của 20E ở các bộ phận của cây đạt hàm lượng cao trong lá non, hoa, quả và trong vỏ của các loài cây gỗ.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định hàm lượng 20E trong mẫu vỏ, cành, lá, hoa của một số loài thực vật Vườn quốc gia Nam Cát Tiên bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Hàm lượng 20E cao nhất trong lá non *Vitex tripinnata* đạt 3,44% khối lượng mẫu khô. Kết quả phân tích cũng cho thấy hai loài *Vitex canescens*, *Vitex tripinnata* là những loài thực vật tiềm năng để làm nguyên liệu sản xuất các chế phẩm chứa ecdysteroids.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Chung, *Các phương pháp nghiên cứu quần xã thực vật*, NXB Giáo dục, 2009.
2. Apichart Suksmrarn, *Ecdysteroids of the root bark of Vitex canescens*, Phytochemistry, 1997, **45**(6):1149-1152.
3. Apichart Suksmrarn, *Ecdysteroids from Vitex canescens*, Phytochemistry, 1995, **38**(2):473-476.
4. Danuse Tarkowska, Miroslav Strnad, *Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effect and relations to plant hormones*, Planta, 2016, **244**:545-555.
5. Dinan L., Lafont R., *Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals*, J. Endocrinol, 2006, **191**:1-8.
6. Jaime A. Teixeira da Silva, Mafatlal M. Kher, M. Nataraj, *Biotechnological advances in Vitex species, and future perspectives*, J. of Generic engineering and Biotechnology, 2016, **14**:335-348.
7. Lafont R., *Practical uses for ecdysteroids in mammals and human: an update*, Insect. Sci., 2003, **3**(7):1-30.
8. Shakhmurova G.A., Mamadalieva N.Z., Zhanibekov A.A., *Effect of total ecdysteroid preparation from Silene viridiflora on the immune state of experimental animals under normal and secondary immunodeficiency conditions*, Pharm. Chem. J, 2012, **46**:222-224.
9. Sivarajan V.V., Pradeep K.A., *Malvaceae of Southern Peninsular India: A Taxonomic Monograph*, Daya Publishing House, New Delhi, India, 1996.
10. Володин В.В., Володина С.О., Ву Тхи Лоан, *Методология изучения распространения экдистероидов в мировой флоре. Первичные результаты скрининга флоры Вьетнама*, J. of Tropical science and technology, 2016, **11**:3-14.
11. Володин В.В., *Экдистероиды растений Урала, Кавказа, Российского дальнего востока и Китая (выбросный скрининг)*, Turczaninowia, 2012, **15**(4):58-75.
12. *Фитоэкдистероиды*, Под ред. В.В. Володина. Санкт-Петербург: Наука, 2003, 293 с.

SUMMARY

THE CONTENTS OF 20-HYDROXYECDYSONE IN SOME PLANTS OF THE NAM CAT TIEN NATIONAL PARK

Phytoecdysteroids are secondary metabolites which were found in many plant species. In mammals, including humans, phytoecdysteroids don't have hormonal activity, low toxicity and are proven to have many pharmacological effects. 20-hydroxyecdysone (20E) is one of the most common phytoecdysteroids which was detected in plants. In this study, 20E was detected in some plants of *Vitex* and *Sida* genera of the Nam Cat Tien national park. HPLC method was used for determining 20E. 3,44% was the highest concentration of 20E picked out from young *Vitex tripinnata* leaves. *Vitex canescens* and *Vitex tripinnata* were considered as potential plants for producing ecdysteroid-containing drugs.

Từ khóa: Nam Cát Tiên, Phytoecdysteroids, Vitex tripinnata, Vitex canescens.

Nhận bài ngày 23 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Sinh học Komi, Viện Hàn lâm khoa học Nga