

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM VI HỌC VÀ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA CỦA CÂY THUỐC THƯỢNG (*Phaeanthus vietnamensis* Ban)

¹Nguyễn Thị Ái Thuận, ²Lâm Bích Thảo và ³Trần Công Luận

¹Trường Đại học Lạc Hồng

²Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM

³Trường đại học Tây Đô (Email: congluan53@gmail.com)

Ngày nhận: 16/4/2017

Ngày phản biện: 20/5/2017

Ngày duyệt đăng: 20/6/2017

TÓM TẮT

Thuốc thượng (Phaeanthus vietnamensis Ban) được sử dụng rất nhiều ở địa bàn tỉnh Quảng Nam, Đà Nẵng để trị một số bệnh như đau mắt đỏ, trị mụn nhọt, tiêu chảy. Tuy nhiên ở trong nước và trên thế giới chưa có nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài cây này. Đề tài nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu khảo sát đặc điểm vi học của Thuốc thượng và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết cao ethanol toàn phần, dịch chiết các phân đoạn, dịch chiết alkaloid theo thử nghiệm DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), đối chiếu với acid ascorbic. Kết quả đề tài đã xác định được những đặc điểm hình thái, đặc điểm vi phẫu thân, lá, và cấu tử của bột dược liệu đặc trưng để định danh Thuốc thượng. Về tác dụng chống oxy hóa, dịch chiết phân đoạn ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 20,57µg/ml (IC₅₀ của acid ascorbic là 2,64 µg/ml).

Từ khóa: *Hoạt tính chống oxy hóa, Phaeanthus vietnamensis, DPPH, ethyl acetat.*

Trích dẫn: Nguyễn Thị Ái Thuận, Lâm Bích Thảo và Trần Công Luận, 2017. Khảo sát đặc điểm vi học và tác dụng chống oxy hóa của cây thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 01: 132-142.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiên cứu về tác dụng sinh học và thành phần hóa thực vật trong các loại cây thuốc đã và đang là xu thế phát triển trong nước và thế giới. Tuy nhiên vẫn còn nhiều loài chưa được nghiên cứu nhiều như Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis*). Loài cây này phát triển nhiều ở vùng rừng núi Thừa Thiên Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng và được dân gian sử dụng để điều trị các căn bệnh như đau mắt đỏ, mụn nhọt, tiêu chảy. Nguyễn Thị Nghĩa và cộng sự (1991) đã khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cây này. Kết quả khảo sát trên lá cũng được công bố (Nguyen Trung Tuong et al., 2016). Để làm sáng tỏ hơn nữa tác dụng của cây này, nhóm nghiên cứu đã khảo sát đặc điểm vi học và sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của cao chiết theo các quy trình chiết xuất khác nhau.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng: Cành và lá cây Thuốc thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) được Đặng Ngọc Phái thu hái (nguyên Phó giám đốc Sở Y tế tỉnh Quảng Nam) ở vùng núi Bà Nà, thành phố Đà Nẵng, vào tháng 3-4 năm 2016. Mẫu được PGS. TS. Nguyễn Tập định danh và lưu mẫu tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. HCM. Nguyên liệu được phơi trong râm đến khô và được xay mịn.

Hóa chất: Các dung môi dùng cho chiết xuất và phân lập gồm: Ethanol, *n*-hexan, *n*-butanol, chloroform, ethyl

acetat, NH₄OH (Trung Quốc). Hóa chất dùng thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), acid ascorbic (Sigma-Aldrich).

Thiết bị: Kính hiển vi quang học Olympus CX22 Led, máy đo UV-Vis Hitachi U-2010 (Nhật), dụng cụ chiết xuất, lắc phân bố và một số dụng cụ thường quy khác.

Khảo sát đặc điểm vi học

Đặc điểm hình thái: Các đặc điểm về dạng sống, thân, lá, hoa, quả được quan sát và mô tả lại.

Đặc điểm vi học:

- *Vi phẫu thân, cuống lá, phiến lá:* Cắt vi phẫu thân, cuống lá và phiến lá bằng dao lam sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm son phen và lục iodroi soi mẫu dưới kính hiển vi, trong nước.

- *Soi bột dược liệu:* Dược liệu khô đem xay mịn, qua rây số 32 rồi quan sát các thành phần trong bột, mô tả, chụp ảnh thành phần dưới cùng kính hiển vi.

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng DPPH

Chiết xuất mẫu thử theo 2 quy trình sau:

Quy trình 1: Chiết ngâm kiệt 100 g dược liệu với ethanol 96%, cô giảm áp thu hồi dung môi được cao toàn phần. Cao này được lắc phân bố với các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan (thu được 4,22 g cao

sau khi thu hồi dung môi), chloroform (1,41 g), ethyl acetat (0,34 g), *n*-butanol (1,53 g), nước (2,79 g).

Quy trình 2: 100 g dược liệu được kiềm hóa với NH₄OH, sau đó chiết ngấm kiệt với chloroform đến khi nào dịch không còn alkaloid (thuốc thử Dragendorff). Dịch chloroform này một phần cô thu hồi dung môi được cao ALK1 (0,31 g, alkaloid thô). Phần còn lại lắc phân bố với HCl 2% thu dịch nước. Dịch nước này được kiềm hóa với NH₄OH đến pH=10, rồi lắc phân bố với chloroform, thu dịch chloroform, cô thu hồi dung môi thu được cao chiết gọi là cao ALK (0,65 g, alkaloid tinh sạch). Phần dịch chloroform sau khi lắc với HCl 2% cô thu hồi được cao Non-ALK (1,45 g, cao nước không có alkaloid). Pha các cao đặc: cao ethanol 96%, *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat, *n*-butanol, nước, ALK1, ALK, Non-ALK trong MeOH thành 5 mức nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính, hút cùng một thể tích mẫu thử cho phản ứng với một lượng thuốc thử DPPH trong MeOH, để hỗn hợp trong tối 30 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Acid ascorbic được dùng làm chất đối chiếu. Mỗi nồng độ tiến hành 3 lần, rồi lấy giá trị trung bình. Tính toán phần trăm hoạt tính chống oxy hóa (% HTCO) theo công thức:

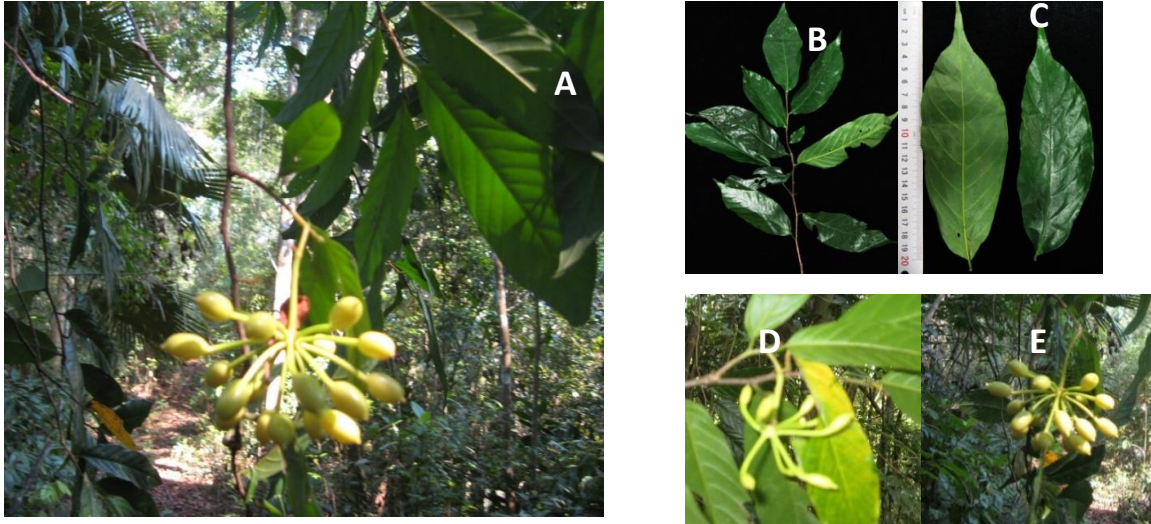
$$\% \text{HTCO} = \frac{(\text{Abs}_{\text{chứng}} - \text{Abs}_{\text{thử}})}{(\text{Abs}_{\text{chứng}} - \text{Abs}_{\text{trắng}})} \times 100$$

Vẽ đồ thị biểu diễn khả năng dập tắt gốc tự do theo nồng độ, xây dựng phương trình hồi quy, từ phương trình này suy ra giá trị IC₅₀ của các cao chiết (Charles, 2012; Huang et al., 2015; Prior R. L et al., 2005; Thangaraj P., 2016).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm vi học

Đặc điểm hình thái: Cây gỗ nhỏ, mọc bụi cao từ 2-10 m, tiết diện tròn, thân màu nâu đen, có nhiều nốt sần. Lá đơn, mọc cách; phiến lá hình bầu dục hoặc hình trứng ngược, gốc và đỉnh nhọn, dài từ 9-20 cm, rộng 3,5-7 cm, màu xanh, mặt trên đậm hơn mặt dưới, mép lá nguyên, gân lá hình lông chim, nổi rõ ở mặt dưới, hai mặt có một ít lông; cuống lá hình lòng máng, màu nâu dài khoảng 0,5-1 cm. Cụm hai hoa mọc so le với lá. Hoa đều, lưỡng tính, mẫu 3. Cuống hoa hình trụ, dài 1,5-3 cm, màu nâu, mang 4-6 lá bắc nhỏ, có lông. Lá đài và cánh hoa ngoài rất giống nhau, dài trên 1 mm. 3 cánh hoa trong, đều, rời, dày, hình bầu dục, đỉnh nhọn, màu vàng nhạt, dài 8-12 mm, rộng 4-6 mm. Nhiều nhị. 8-20 lá noãn rời, mỗi lá noãn tạo thành bầu 1 ô. Sau phát triển thành phân quả hình trái xoan, cỡ 12-15 x 6-7mm, khi chín màu vàng sau chuyển thành màu mận chín; cuống dài 13-15 mm; vỏ quả rất mỏng.

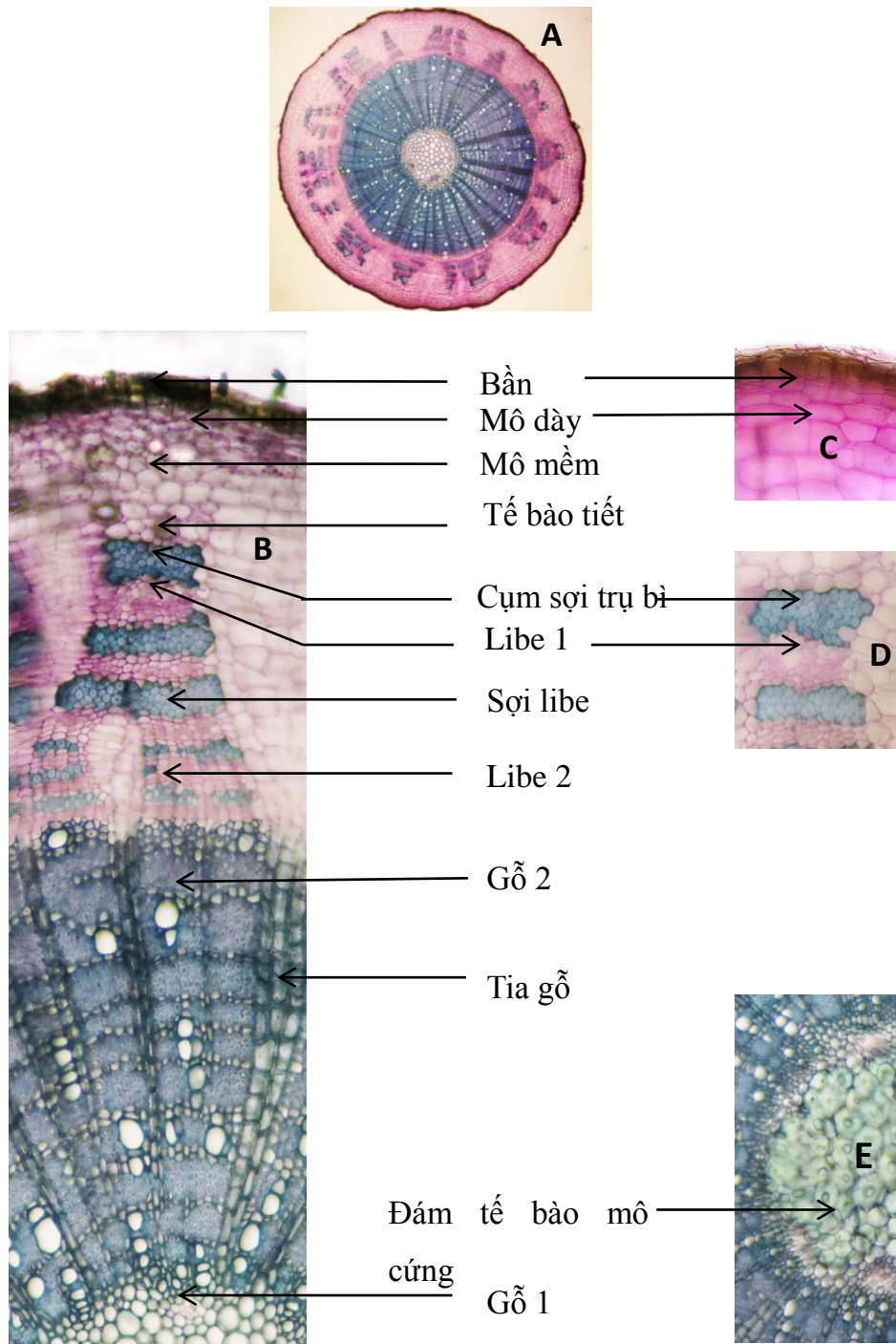


Hình 1. Đặc điểm hình thái cây Thuốc thượng
A. Cây trong tự nhiên; B. Cành mang lá; C. Lá; D,E. Phân quả

Đặc điểm vi phẫu

Thân: Thân có tiết diện tròn (Hình 2). Vùng vỏ mỏng chiếm 1/6 bán kính vi phẫu: Ở thân non, bên ngoài cùng là biểu bì, hình đa giác hoặc hình chữ nhật, rải rác có các lông che chở đa bào một dãy, gồm 3-6 tế bào, ở thân già hơn, ngoài cùng sẽ là bản gồm 3-4 lớp tế bào, đôi khi gặp các lỗ vỏ. Bên dưới vẫn còn 2-3 lớp mô dày góc, kích thước không đều (Hình 2C). Dưới nữa là mô mềm đạo tế bào hình đa giác. Vùng trung trụ chiếm 5/6 bán kính vi phẫu: Hệ thống dẫn cấp 2 kiểu hậu thể liên tục, tia libe loe rộng tạo thành những chùy libe không đều nhau, với trụ bì ở ngoài cùng gồm 5-6 lớp tế bào, hóa sợi với vách gỗ dày, tập trung thành từng cụm không liên tục bao ngoài libe 1

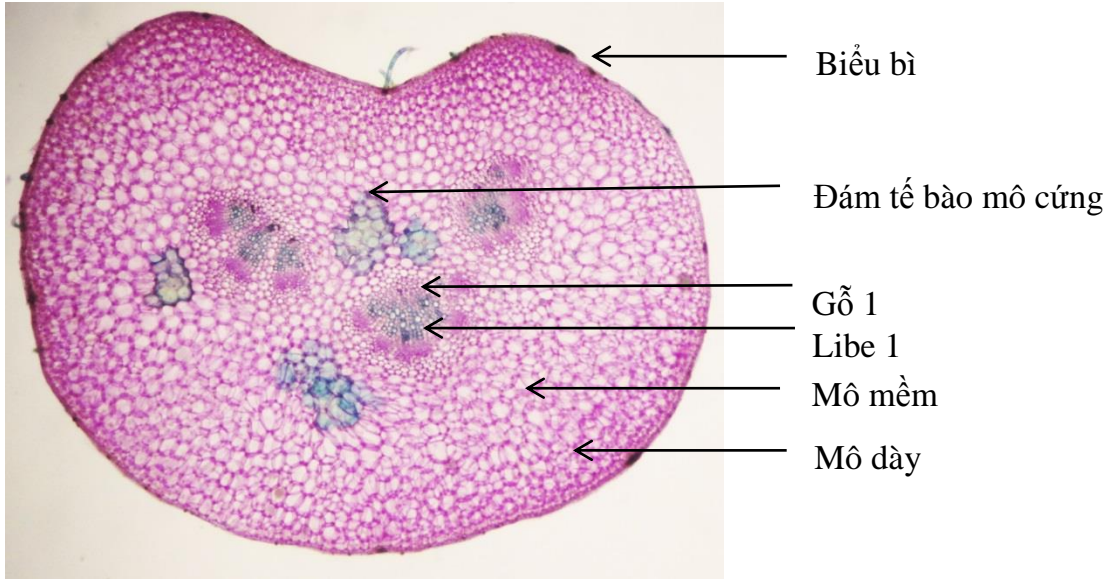
(2-4 lớp tế bào vách uốn lượn dẹt lại do bị libe 2 đẩy ra ngoài); vùng libe 2 gồm mô mềm libe 2 xen kẽ các cụm sợi libe (libe 2 kết tầng); mỗi tầng libe 2 là 5-8 lớp tế bào; mỗi tầng sợi libe gồm 3-4 lớp tế bào. Vùng gỗ 2 phát triển mạnh chiếm 1/2 bán kính vi phẫu, mạch gỗ 2 hình gần tròn, kích thước không đều nhau, nằm rải rác trên toàn vi phẫu, mô mềm gỗ 2 hình đa giác, xếp xuyên tâm. Trong vùng gỗ 2 có nhiều các tia gỗ phát triển rõ rệt (Hình 2B). Vùng gỗ 1 nằm dưới vị trí các cụm libe 1, mỗi bó gồm 2-3 mạch gỗ, phân hóa li tâm; mô mềm gỗ 1 hình đa giác, vách bằng cellulose sắp xếp lộn xộn. Mô mềm tủy hóa mô cứng, đôi chỗ gặp đám tế bào mô cứng, hình đa giác, xếp sát vào nhau (Hình 2E).



Hình 2. Vi phẫu thân Thuốc thượng
 A. Toàn vi phẫu thân; B. Cấu tạo chi tiết

Cuống lá: Cuống lá có tiết diện hình lòng máng, ngoài cùng là lớp tế bào biểu bì với ít lông che chở đa bào, bên dưới là 1-3 lớp tế bào mô dày góc; trong nữa là mô mềm khuyết, đặc biệt bên trong mô mềm

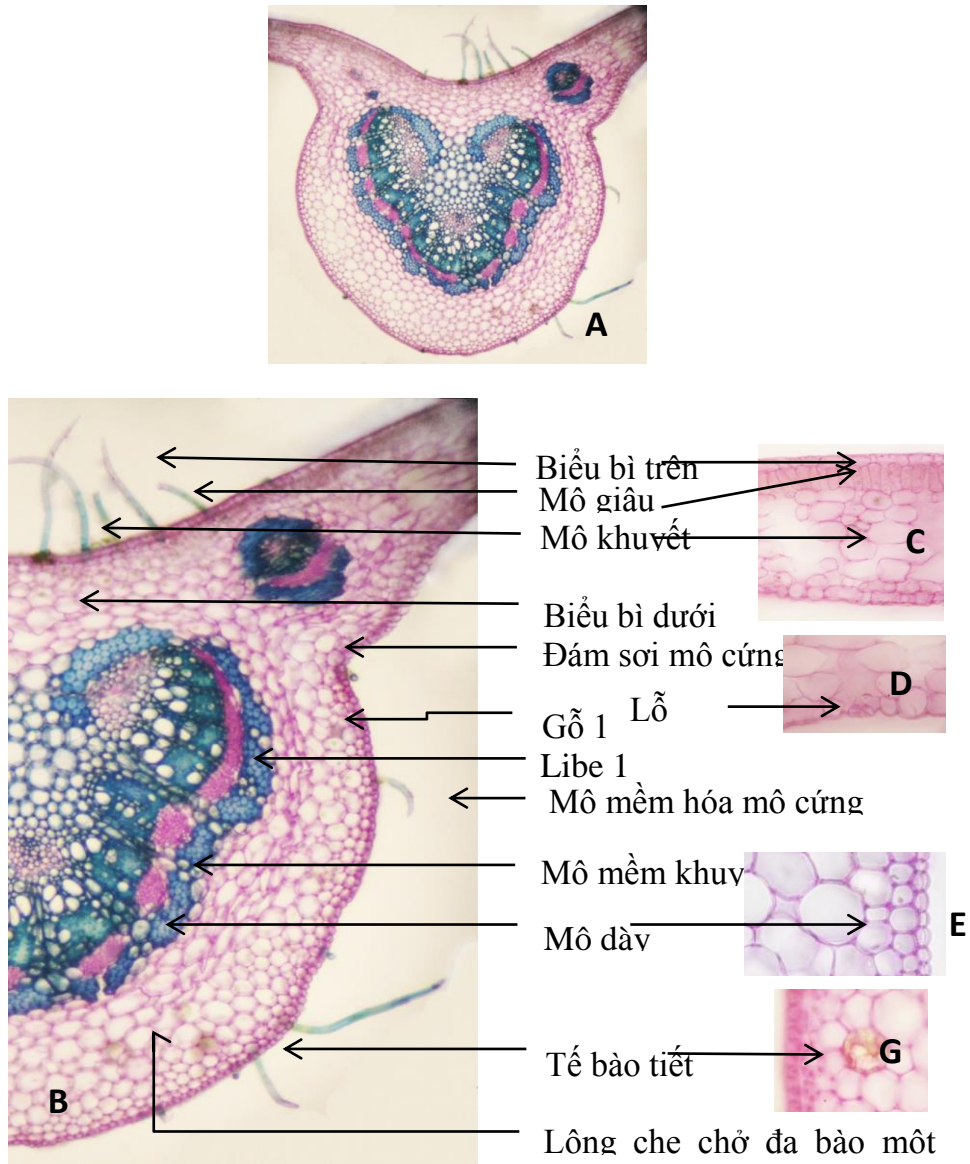
có rải rác vài cụm tế bào mô cứng và các tế bào tiết. Hệ thống dẫn chia thành ba cụm riêng rẽ, mỗi cụm đều có gỗ 1 ở trên là libe 1 ở dưới (Hình 3).



Hình 3. Vi phẫu cuống lá Thuốc thượng

Lá: Gân giữa có mặt trên lõm, mặt dưới lồi rõ (Hình 4). Biểu bì trên và dưới gồm một lớp tế bào, có lông che chở đa bào một dãy gồm 3-6 tế bào tập trung nhiều ở chỗ lõm của mặt trên và rải rác ở mặt dưới lá. Mô dày trên và dưới đều là mô dày góc, chỉ gồm 2-3 lớp tế bào vách dày lên rất ít. Mô mềm bao quanh hệ thống dẫn là mô mềm khuyết, rải rác trong vùng mô mềm có các tế bào tiết. Hệ thống dẫn bị chia cắt bởi các dãy mô mềm là vết tích của tia gỗ tạo thành nhiều bó xếp thành hình vòng cung với gỗ 1 ở trên và libe 1 ở dưới (Hình 4). Bao ngoài bó dẫn là đám sợi mô

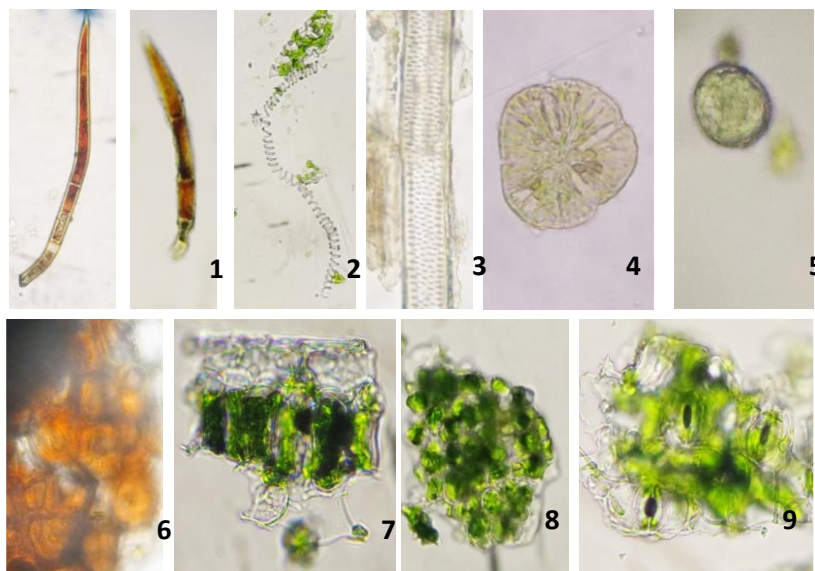
cứng, gồm 2-4 lớp tế bào hình đa giác, vách tâm gỗ dày, xếp thành từng cụm bên dưới libe 1, bên trên chia thành hai cụm lớn ở hai bên, giữa hai cụm sợi mô cứng này là mô mềm hóa gỗ. Hai bên có thể có bó gân phụ cấu trúc giống với bó gân chính. *Phiến lá:* có cấu tạo dị thể bất đối xứng. Biểu bì trên và dưới gồm một lớp tế bào, biểu bì dưới mang nhiều lỗ khí kiểu song bào. Mô mềm giậu gồm 1 lớp, xếp sát nhau vuông góc với biểu bì trên. Mô mềm khuyết bên dưới có hình thuôn dài, sắp xếp để hở những khuyết lớn.



Hình 4. Vi phẫu lá Thuộc thượng (A.Toàn vi phẫu; B. Chi tiết vi phẫu; C. Vi phẫu phiến lá; D. Mảnh biểu bì mang lỗ khí; Biểu bì và mô dày; G. Tế bào tiết trong mô mềm)

Đặc điểm bột dược liệu: Bột dược liệu Thuốc thượng có màu xanh hơi nâu, có mùi đặc trưng, vị đắng. Soi bột dưới kính hiển vi thấy nhiều lông che chở đa bào một dãy, nhiều mảnh biểu bì với lỗ khí hoặc biểu bì

tế bào hình chữ nhật và một lớp tế bào mô giậu vuông góc ở bên dưới; rải rác bắt gặp đầu lông tiết đơn bào và các loại mạch như mạch xoắn (nhiều), mạch mạng, ngoài ra còn có các đám tế bào mô cứng (Hình 5).



Hình 5. Đặc điểm soi bột dược liệu

1. Lông che chở đa bào; 2. Mạch xoắn; 3. Mạch mạng; 4,5. Đầu lông tiết;
6. Đám tế bào mô cứng; 7,8. Biểu bì và mô giậu; 9. Biểu bì và lỗ khí;

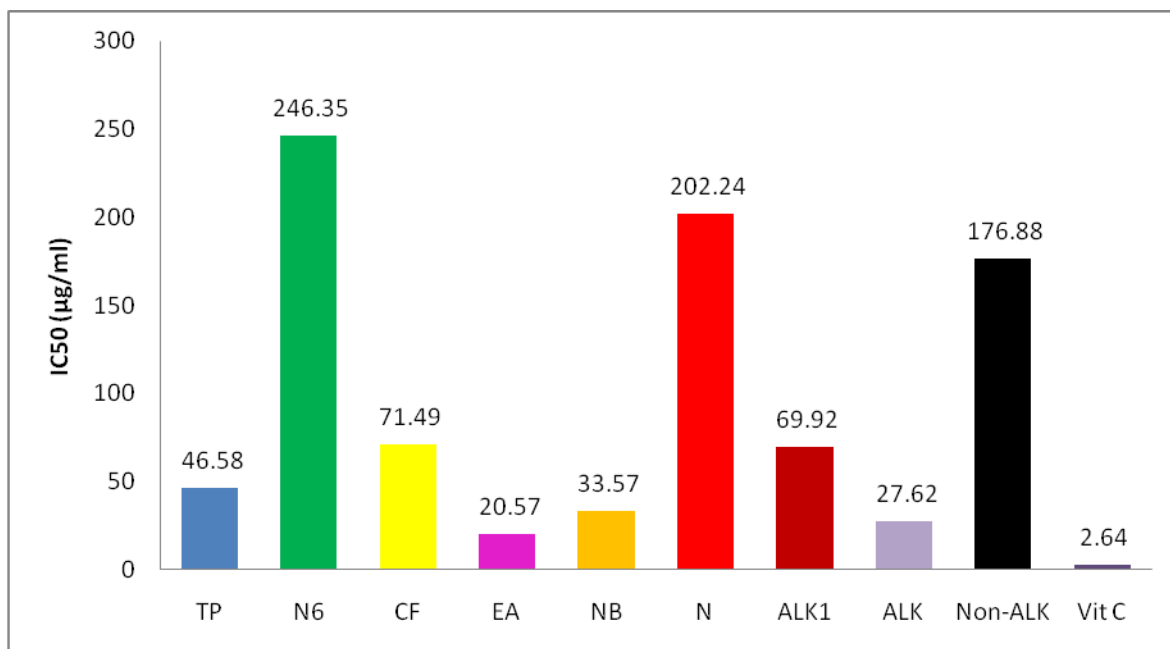
3.2. Hoạt tính chống oxy hóa của các cao phân đoạn

Sau khi tiến hành đo độ hấp thu, xây dựng phương trình hồi quy của các cao chiết theo mô hình sử dụng

DPPH, kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa (IC_{50}) của các cao chiết và acid ascorbic được thể hiện trong Bảng.1.

Bảng 1. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) của các cao thử nghiệm

Tên cao	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Tên cao	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ethanol 96% (TP)	46,579	Nước	202,243
<i>n</i> -Hexan (N6)	246,347	ALK1	69,923
Chloroform (CF)	71,489	ALK	27,617
Ethyl acetat (EA)	20,571	Non-Alk	176,876
<i>n</i> -Butanol (NB)	33,571	Acid ascorbic (Vit C)	2,641



Hình 6. Đồ thị biểu diễn HTCO của các cao thử nghiệm

Kết quả sàng lọc (Hình 6) cho thấy cao ethyl acetat có tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất, với $IC_{50} = 20,57 \mu\text{g/ml}$, kế đến là cao ALK, $IC_{50} = 27,61 \mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên, hoạt tính của cả hai cao này vẫn thấp hơn rất nhiều so với chứng dương là vitamin C, $IC_{50} = 2,64 \mu\text{g/ml}$. Khi sàng lọc tác dụng chống oxy hóa theo độ phân cực, HTCO của các cao giảm dần theo độ phân cực từ cao *n*-hexan đến cao chloroform rồi cao ethyl acetat. Sau đó lại tăng dần từ cao ethyl acetat đến cao *n*-butanol và cao nước. Như vậy, các cao có độ phân cực trung bình có HTCO cao hơn các phân đoạn kém phân cực cũng như phân cực. Thông thường, trong các dược liệu đây là những cao phân đoạn chứa nhiều các nhóm hợp

chất polyphenol, có tác dụng chống oxy hóa (Prior et al., 2005).

4. KẾT LUẬN

Sau thời gian nghiên cứu, nhóm đã xây dựng được các tiêu chuẩn về đặc điểm vi phẫu thân, lá, bột của dược liệu Thuộc thượng. Đồng thời, cũng đã sàng lọc định hướng cho tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của dược liệu này và xác định được, cao phân đoạn ethyl acetat có tác dụng chống oxy hóa mạnh với giá trị IC_{50} là $27,617 \mu\text{g/ml}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế, 2009. Dược điển Việt Nam IV, tr. PL-182, PL-183, PL-239.
2. Võ Văn Chi, 1997. Từ điển cây thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, tr. 1230-1232.

3. Trương Thị Đẹp, 2007. Thực vật Dược, Nhà xuất bản Giáo dục, tr. 189-190.
4. Lê Thị Ngọc Ngân, 2014. Nghiên cứu chiết tách và xác định thành phần hóa học của cây thuốc thượng (Phaeanthus vietnamensis Ban) ở Quảng Nam Đà Nẵng trong dịch chiết hữu cơ. Luận văn Thạc sĩ.
5. Charles D. J., 2012. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources, Springer Science & Business Media.
6. Huang D., Ou B. , Prior R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry. 53 (6),pp.1841-1856.
7. Nghia N. T., Válka I., Weigl E., Simanek V., Cortes D. , Cavé A., 1991. Alkaloids from leaves of Phaeanthus vietnamensis. Fitoterapia. 62,pp.315-318.
8. Nguyen Trung Tuong P. T. K., Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhiem, 2016. Alkaloids isolated from the leaves of Phaeanthus vietnamensis Ban. Science Magazine.
9. Prior R. L., Wu X. , Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of agricultural and food chemistry. 53 (10),pp.4290-4302.
10. Thangaraj P. (2016), Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products, Springer.

**STUDYING IN MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, ATOMICAL
STRUCTURE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
PHAEANTHUS VIETNAMENSIS**

¹Nguyễn Thị Ái Thuận, ²Lâm Bích Thảo và ³Trần Công Luận

¹Lac Hong University

²Research center of Gingsen and Medical materials, Ho Chi Minh city

³Faculty of Pharmacy and Nursing, Tay Do University (Email: congluan53@gmail.com)

ABSTRACT

Phaeanthus vietnamensis Ban has been used to treat redehyes, diarrhea. However, there are currently not many scientific evidences for anatomical characteristics, chemical composition and pharmacological effects of this species. The antioxidant property of the extract and fractions was investigated by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay. Results showed that the ethyl acetate fraction exhibited the best activity in DPPH compared to the other fractions in this research. IC_{50} for antioxidant activity was 20,57 $\mu\text{g/ml}$, in relation with the standard, ascorbic acid ($IC_{50}=2,64 \mu\text{g/ml}$). Therefore, ethyl acetate fraction of this medicinal plant, showed significant antioxidant activity, which could contribute in the mechanism of above pharmacological actions.

Keywords: Antioxidant, *Phaeanthus vietnamensis* Ban, DPPH, ethyl acetate, anatomical