

NGHIÊN CỨU BẢO CHẾ TRÀ THẢO DƯỢC TỪ LOÀI VẪY ỐC (*Ficus pumila* L.) VÀ THỔ PHỤC LINH (*Smilax glabra* Roxb)

Lê Thế Hoài¹, Nguyễn Thị Thanh Mai^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Hạnh²

¹ Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

² Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: thanhmaint@hau.edu.vn

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hợp chất kaempferol (3,4',5,7 – tetrahydroxyflavone) được tìm thấy trong dịch trích ly từ loài Vẩy ốc (*Ficus pumila* L.) được thu hái tại huyện Trùng Khánh, tỉnh Cao Bằng. Kaempferol là hợp chất có hoạt tính chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, trị đái tháo đường và bảo vệ thần kinh. Trên cơ sở đó, trà thảo dược được bảo chế từ dịch trích ly ethanol - nước của loài Vẩy ốc kết hợp với Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb) - một dược liệu có hoạt tính sinh học đa dạng giúp khử phong thấp, tiêu độc, giảm đau và chống viêm, tăng cường sức mạnh gân cốt, chữa đau xương khớp. Dược chất kaempferol có trong thành phẩm trà thảo dược đã được định lượng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, hàm lượng khoảng $98,3 \pm 2,01$ mg/g. Độc tính cấp của sản phẩm trà thảo dược đã được khảo sát trên phôi cá ngựa vằn theo hướng dẫn của tổ chức OECD 236, kết quả cho thấy, sản phẩm không có độc tính. Sản phẩm trà thảo dược được xác định các chỉ tiêu hóa lý như: Độ ẩm 3,22%, độ tro 11,28%, đạt yêu cầu theo TCVN 9739:2013.

Từ khóa: Vẩy ốc, trà thảo dược, kaempferol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm khớp dạng thấp là một bệnh viêm đa khớp, bệnh có thể ảnh hưởng lên các cơ quan ngoài khớp như: Viêm mao mạch, gân, cơ, dây chằng, bao khớp, viêm màng ngoài tim, rối loạn nhịp tim, van tim, hội chứng thiếu máu... Theo Bộ Y tế (2016), tại Khoa Cơ xương khớp, Bệnh viện Bạch Mai, từ năm 1991 - 2000 cho thấy, tỷ lệ bệnh viêm khớp dạng thấp chiếm 21,94%, trong đó nữ giới chiếm 92,3%, lứa tuổi thường gặp từ 36 – 65 (72,6%) [1]. Một trong các mục đích điều trị căn bệnh này là giảm tối đa cảm giác đau của người bệnh do ảnh hưởng của hội chứng viêm sinh học.

Vẩy ốc (*Ficus pumila* L.) còn có tên gọi khác như: Cây Sộp, Bì lệ, quả là Vương bất lưu hành. Theo y học cổ truyền, lá và rễ cây có tính mát, tác dụng trừ phong tiêu thũng, hoạt huyết giải độc

[2]. Các nghiên cứu cho thấy, Vẩy ốc có chứa một số thành phần hóa học như: Dehydrovomifolol (6R,9S)-3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside có hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên các dòng tế bào Hela, MCF-7 và A549, neohopane được phân lập từ loài Vẩy ốc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với chủng *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* và *Candida albicans* với giá trị IC₅₀ lần lượt là: 0,5; 0,3; 0,3; 0,7 ở nồng độ 30 μ g/mL; pumilaside A, B và C cùng với benzyl β -D-glucopyranoside, (E)-2-methyl-2-butenyl β -D-glucopyranoside là những hợp chất có hoạt tính sinh học đa dạng [3 - 7]. Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb) là loài thảo dược có tính bình, chứa các hợp chất: Astilbin, neoastilbin, isoastilbin, engeletin, isoengeletin, là những hợp chất có khả năng kháng viêm, chống oxy hóa và điều hòa miễn

dịch... Sự kết hợp giữa Vẩy ốc và Thổ phục linh với nhau theo tương tu, có khả năng tương hỗ làm tăng cường hiệu quả kháng viêm, giảm đau [8 - 10].

Hiện nay, đã có nghiên cứu trong nước về việc sử dụng loài Vẩy ốc tạo sản phẩm giúp giảm thiểu đau nhức xương khớp. Tuy nhiên, các sản phẩm nghiên cứu về trà thảo dược từ Vẩy ốc có bổ vị Thổ phục linh vẫn chưa được công bố. Vì vậy, nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập được hợp chất có tác dụng kháng viêm, giảm đau, chống oxy hóa kaempferol (3,4',5,7 - tetrahydroxyflavone) từ dịch chiết ethanol - nước của loài Vẩy ốc, phân tích hàm lượng được chất này trong chế phẩm và bước đầu kiểm chứng độ an toàn của sản phẩm bằng phương pháp khảo sát độc tính cấp trên phôi cá ngựa vằn theo hướng dẫn của OECD 236.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Thân, lá, rễ loài Vẩy ốc (*Ficus pumila* L.) khô; rễ Thổ phục linh (*Smilax glabra* Roxb) được lấy từ huyện Trùng Khánh, tỉnh Cao Bằng; mẫu tiêu bản cây được lưu giữ tại Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội. Cá ngựa vằn bố mẹ được ghép đôi để thu phôi mới thụ tinh, nghiên cứu tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, thiết bị

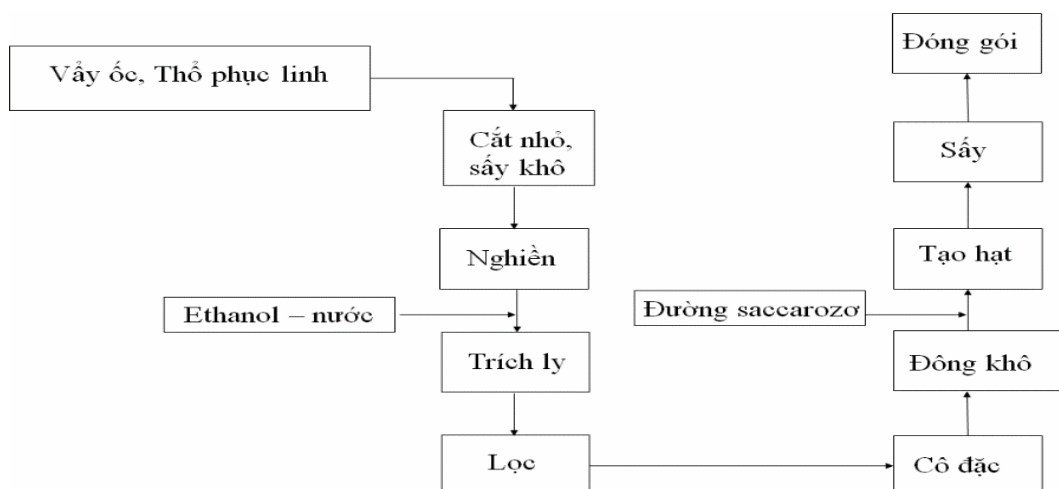
Hóa chất: Ethanol (EtOH) (HPLC grade_Fisher Scientific, Mỹ); *n*-Hexane; Ethyl Acetate (EtOAc); Methanol (MeOH) độ tinh khiết 99%, Sigma Aldrich; Methanol (MeOH) (HPLC grade_Fisher Scientific, Mỹ); bản mỏng TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Damstadt, Đức); nước phân tích (H₂O) (HPLC grade _Fisher Scientific, Mỹ); phosphoric acid (H₃PO₄) (Merck, Đức); chất tham chiếu kaempferol độ sạch 98% (Sigma Aldrich, Mỹ).

Thiết bị: Tủ sấy chân không Memmert VO200 (Memmert, Berlin, Đức); máy cô quay chân không; máy nghiền búa nhiều mắt sàng; máy đông khô Lyovapor L300. Phổ NMR được đo trong dung môi DMSO trên máy Bruker Avance (Brucker, Berlin, Đức) tại tần số 600 MHz và 150 MHz tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; máy HPLC-DAD: Agilent 1100 Series Single; cột sắc ký: Hector-M C18 250 x 4,6 mm, 5 µm; cân điện tử (max 220 g, d = 10⁻⁴ g), model: PRACTUM224 – 1S (Sartorius Lab, Micropipet loại 200, 1.000 µL, ống eppendorf 2 mL (Eppendorf, Đức); màng lọc mẫu có kích thước lỗ lọc 0,22 µm (Membrane Solutions, Mỹ); bình định mức 500 mL, 5 mL (Duran, Đức).

2.2.2. Phân lập và xác định hợp chất kaempferol trong mẫu Vẩy ốc

Vẩy ốc (350 g) được ngâm chiết với EtOH 70°; dịch trích ly được thu hồi và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 55,09 g cao chiết EtOH; tiếp tục chiết phân bố lần lượt với *n*-hexan và ethyl acetate thu được hai loại cặn chiết tương ứng. Cặn ethyl acetate (EtOAc) (10,57 g) được phân tích trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi tăng dần từ *n*-hexan đến MeOH thu được 8 phân đoạn ký hiệu là VO1 đến VO8. Phân đoạn VO4 (2,3 g) được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải tăng dần từ *n*-hexan đến (CH₂Cl₂-MeOH 8: 2) thu được 4 phân đoạn (VO4.1 đến VO4.4). Phân đoạn VO 4.2 (0,89 g) đưa lên cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH với tỉ lệ 99: 1 đến 9: 1 thu được 3 phân đoạn (VO4.2.1 đến VO4.2.3). Phân đoạn VO4.2.2 (198,5 mg) để kết tinh lại, rửa bằng MeOH thu được hợp chất VO2 (185 mg) dưới dạng tinh thể, sau khi tinh chế và tiến hành xác định cấu trúc hợp chất VO2 bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR.

2.2.3. Quy trình bảo chế trà thảo dược



Hình 1. Sơ đồ quy trình bảo chế trà thảo dược Vây ốc

Nguyên liệu Vây ốc, Thổ phục linh được băm nhỏ, thái mỏng, sấy chân không ở nhiệt độ 45°C trong 74 giờ đến khi hàm ẩm còn khoảng 10%. Mẫu được đưa qua máy nghiền búa có sàng 60 Mesh. Phối trộn hai nguyên liệu theo tỷ lệ 5: 1 (5.000 g Vây ốc: 1.000 g Thổ phục linh). Hai loài này có thể bổ trợ cho nhau để tăng mục đích sử dụng theo tương tu [11, 12].

Hỗn hợp nguyên liệu được trích ly bằng hệ dung môi ethanol - nước (3 giờ/1 lần) ở 60°C, tỷ lệ 100/350 g được liệu/ml dung môi chiết, quá trình chiết lặp lại 3 lần để tận thu dược chất. Lọc loại bã, gộp chung dịch chiết của các lần chiết, rồi đem cất loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không với chế độ 60°C; 0,6 atm, thu được cao chiết thành phẩm 1.203,6 g, hiệu suất chiết đạt khoảng 20% (tính trên khối lượng hỗn hợp nguyên liệu khô).

Đông khô cao chiết bằng thiết bị Lyovapor L300 đến hàm ẩm 5%, tránh nhựa hóa sản phẩm khi dùng nhiệt và để dễ nghiền nhỏ trộn bột kếp. Phối trộn 50 g cao chiết đã được đông khô với 10 g bột đường, tiến hành tạo hạt qua rây, đem sấy ở nhiệt độ 45°C, sau 6 giờ tiếp tục rây sản phẩm để sửa cho hạt có kích thước đồng đều, thuận lợi cho việc làm khô sản phẩm, rồi sấy cho đến khi hàm ẩm còn 5%. Tiến hành đóng gói sản phẩm trà thảo dược và bảo quản trong túi kín với khối lượng 0,5 g/gói.

2.2.4. Phương pháp phân tích hàm lượng dược chất kaempferol trong mẫu trà thảo dược [13]

- Chuẩn bị chất tham chiếu: Mẫu chất tham chiếu kaempferol được pha trong dung môi EtOH, sau đó pha loãng thành dãy các nồng độ khác nhau trong khoảng từ 10 - 300 µg/mL để thiết lập đường chuẩn định lượng.

- Chuẩn bị mẫu phân tích: Mẫu được hòa tan hoàn toàn trong EtOH, rồi pha loãng đến nồng độ thích hợp để tiến hành phân tích.

Điều kiện phân tích được thiết lập dựa theo điều kiện tham khảo từ Dược điển Việt Nam V [13].

Bảng 1. Điều kiện phân tích kaempferol bằng phương pháp HPLC-DAD

Hệ thống HPLC	Agilent 1100 series single
Cột	Hector-M C18 250 x 4,6 mm, 5 µm
Nhiệt độ cột	40°C
Nhiệt độ ủ mẫu	25°C
Tốc độ dòng	1,2 mL/phút
Thể tích tiêm mẫu	10 µL
Bước sóng phát hiện	360 nm
Pha động	MeOH - H ₃ PO ₄ 0,4% (55: 45) (isocratic)

Hàm lượng chất tham chiếu (H_k - mg/g) trên trong mẫu phân tích, sau khi được xử lý và phân tích ở cùng điều kiện với các chất chuẩn (lặp lại ba lần), được xác định theo công thức sau:

$$H_k = \frac{S-b}{a} \times \frac{1}{C_0} \times P \text{ (mg/g)}$$

Trong đó: S là diện tích tín hiệu; b là hệ số tự do của phương trình đường chuẩn ($b = -201,5$); a là hệ số góc của phương trình đường chuẩn ($a = 33,2$); C_0 là nồng độ của mẫu đo (mg/mL); P là độ sạch của chất chuẩn theo HPLC ($P = 98\%$).

2.2.5. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu hóa lý, vi sinh của trà Vẩy ốc

- Độ ẩm được xác định theo TCVN 9741:2013 [14].

- Hàm lượng tro được xác định theo TCVN 9742:2013 [15].

Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 4884-1:2015 [16].

Xác định vi khuẩn *E. coli* theo TCVN 7924-2:2008 [17].

Xác định vi khuẩn *Coliform* theo TCVN 6848:2007 [18].

- Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc theo TCVN 8275-2:2010 [19].

2.2.6. Phương pháp đánh giá độc tính in vivo

Bảng 2. Nồng độ bố trí thí nghiệm

Mẫu thử nghiệm	Đơn vị tính	1	2	3	4	5
Tỷ lệ pha	Gói/mL	1: 500	1: 1.000	1: 1.250	1: 1.500	1: 2.000
Nồng độ	µg/mL	20.000	10.000	8.000	6.667	5.000

Kết quả phân tích được đối chiếu với tiêu chuẩn phân loại nhóm chất có độc tính theo tiêu chuẩn của Hệ thống điều hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất (GHS) được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Đánh giá LC50 (Acute toxicity estimate - ATE) theo tiêu chuẩn GHS [20, 21]

Đường phơi nhiễm	Độc 1	Độc 2	Độc 3	Độc 4	Độc 5
Ăn uống (mg/kg thể trọng)	$ATE \leq 5$	$5 \leq ATE \leq 50$	$50 \leq ATE \leq 300$	$300 \leq ATE \leq 2.000$	$2.000 \leq ATE \leq 5.000$
Da (mg/kg thể trọng)	$ATE \leq 50$	$50 \leq ATE \leq 200$	$200 \leq ATE \leq 1.000$	$1.000 \leq ATE \leq 2.000$	

- Cá ngựa vằn bố mẹ được ghép đôi để thu phôi mới thụ tinh. Các phôi được rửa sạch và chuyển sang đĩa petri 90 mm. Đến giai đoạn từ 4 – 16 tế bào, chọn lọc những cá thể phát triển đồng đều.

- Hóa chất thử nghiệm được chuẩn bị trong chai thủy tinh 500 mL, gói chế phẩm thử nghiệm (10 g bột trà thảo dược) được hòa tan trong 250 mL E3 (nước nuôi phôi bao gồm 4 muối thành phần: 5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM $CaCl_2$; 0,33 mM $MgSO_4$). Các nồng độ thí nghiệm được pha từ dung dịch gốc ngay trước khi sử dụng. Dung dịch thử nghiệm gốc được thay mới mỗi tuần.

- Phôi cá ngựa vằn sau khi chọn lọc sẽ được chuyển sang đĩa 6 giếng đã chứa các nồng độ hóa chất thử nghiệm (Bảng 2). Mật độ phôi cá ngựa vằn trong mỗi giếng là 20 phôi, thể tích dung dịch thử là 5 mL.

- Từ khi tiến hành thí nghiệm cho đến 96 giờ, hàng ngày vào một giờ xác định tương ứng với giờ bắt đầu thí nghiệm, đĩa nuôi phôi cá ngựa vằn sẽ được quan sát để ghi nhận số lượng phôi tử vong và có bất thường hình thái. Kết quả thu được sẽ được phân tích trong phần mềm Graph Pad Prism 8.0. Thử nghiệm chính thức được thực hiện ít nhất 3 lần lặp lại với dải nồng độ được thể hiện ở bảng 2.

Không khí (ppmV)	ATE ≤ 100	100 ≤ ATE ≤ 500	500 ≤ ATE ≤ 2.500	2.500 ≤ ATE ≤ 20.000	
Hơi (mg/l)	ATE ≤ 0,5	0,5 ≤ ATE ≤ 2,0	2,0 ≤ ATE ≤ 10,0	10,0 ≤ ATE ≤ 20,0	
Dạng bụi và sương mù (mg/l)	ATE ≤ 0,05	0,05 ≤ ATE ≤ 0,5	0,5 ≤ ATE ≤ 1,0	1,0 ≤ ATE ≤ 5,0	

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích thành phần kaempferol trong mẫu nghiên cứu

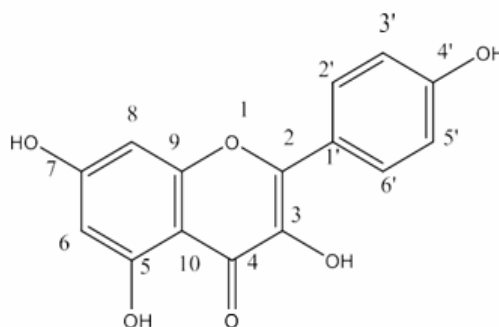
3.1.1. Kết quả xác định sự có mặt của kaempferol trong mẫu nghiên cứu

Hợp chất VO2 (185 mg) được kết tinh dưới dạng tinh thể, sau khi tinh chế. Tiến hành xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$, so sánh với kết quả nghiên cứu của Bai M và cs (2019) cho thấy, hợp chất phân lập được chính là 3,4',5,7 - tetrahydroxyflavone (kaempferol) [6].

Kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ , ppm): 12,46 (1H, s, 5-OH); 10,75 (1H, s, 3-OH); 10,07 (1H, s, 7-OH); 8,04 (2H, dd, $J = 9$ Hz, H-2' & H-6'), 6,43 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8); 6,92 (2H, dd, $J = 9$ Hz, H-3' & H-5'); 6,18 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6), 6,0 (1H, s, H-8).

Kết quả phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, δ , ppm): 175,8 (C-4); 163,8 (C-7); 159,1 (C-9); 146,7 (C-2); 156,1 (C-4'); 135,6 (C-3); 129,4 (C-2' & C-6'); 115,3 (C-3' & C-5'); 121,6 (C-1'); 103,0 (C-10); 98,1 (C-5 & C-6); 93,4 (C-8).

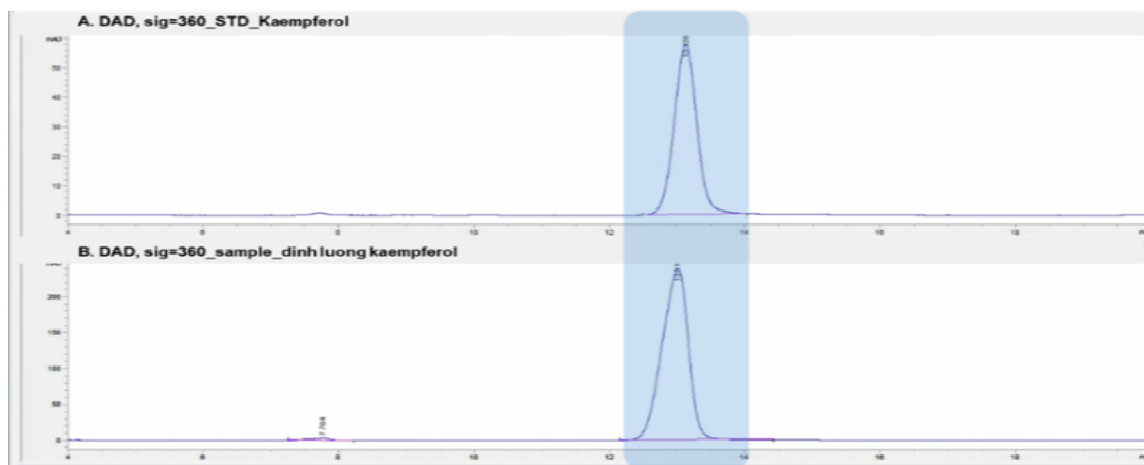
Qua đó cho thấy, trong thành phần dịch chiết ethanol - nước của dược liệu Vảy ốc được sử dụng dùng để chế tạo trà có chứa hợp chất 3,4',5,7 - tetrahydroxyflavone (kaempferol).



Hình 2. Công thức cấu tạo của kaempferol

3.1.2. Kết quả xác định hàm lượng kaempferol trong mẫu trà thảo dược

Trên hệ thống HPLC, tín hiệu được lựa chọn của kaempferol được phát hiện một cách ổn định với thời gian lưu Rt trong khoảng 13,0 - 13,1 phút đối với các mẫu chất tham chiếu dùng trong thang định lượng. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên diện tích tín hiệu trên sắc ký đồ ở bước sóng UV 360 nm tại thời gian lưu tương ứng.



Hình 3. Sắc ký đồ của kaempferol (A) và mẫu phân tích (B) ở bước sóng 360 nm

Thiết lập đường chuẩn: Đường chuẩn định lượng có dạng $y = ax + b$ được xây dựng dựa trên mối quan hệ giữa diện tích pic UV được chọn (y) và nồng độ tương ứng của chất tham chiếu (x).

Đường chuẩn định lượng thu được đạt độ tuyến tính cao với hệ số tương quan $R^2 \geq 0,99$ đối với phương pháp định lượng bằng DAD.

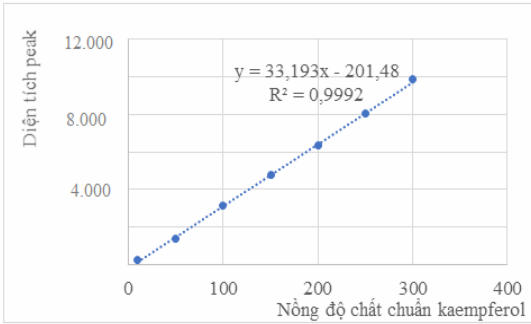
Bảng 4. Dải nồng độ và diện tích tín hiệu phân tích

C (µg/mL)	10	50	100	150	200	250	300
Diện tích peak	254,3 ± 1,0	1.341,7 ± 3,3	3.164,8 ± 3,2	4.752,0 ± 7,2	6.346,6 ± 7,9	8.031,3 ± 3,4	9.884,0 ± 5,4

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng cách phân tích 8 mẫu có nồng độ thấp (5 µg/mL), sau đó tính độ lệch chuẩn trung bình (SD) của các tín hiệu. LOD và LOQ được xác định bằng các công thức:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a} \text{ và } LOQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

Với a là hệ số góc của phương trình đường chuẩn.



Hình 4. Đường chuẩn của chất tham chiếu kaempferol

Kết quả các lần phân tích LOD và LOQ được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. LOD và LOQ của phương pháp phân tích

C (µg/mL)	Diện tích tín hiệu	SD	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
5	126,35	10,36	1,03	3,12
5	152,85			
5	153,95			
5	143,45			
5	128,53			
5	142,89			
5	143,53			
5	133,36			

Sau khi xử lý mẫu phân tích và xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện LOD: 1,03 (µg/mL) và giới hạn định lượng LOQ: 3,12 (µg/mL).

Bảng 6. Kết quả định lượng kaempferol trong mẫu phân tích

Số lần lặp lại	Diện tích tín hiệu	Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Kết quả (mg/g)	Trung bình (mg/g)
Lần 1	7.248,1	2,2	100,5	98,3 ± 2,01
Lần 2	7.055,2	2,2	97,9	
Lần 3	6.955,0	2,2	96,6	

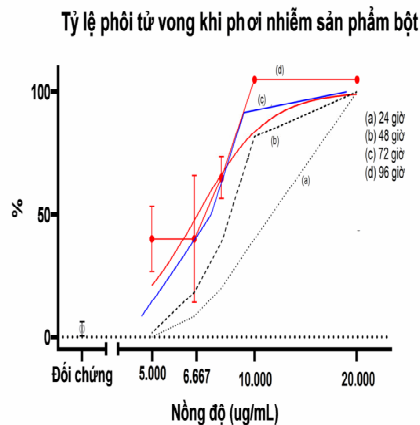
Như vậy, bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, đã xây dựng được đường chuẩn và xác định hàm lượng kaempferol có trong mẫu phân tích. Phương pháp phân tích có độ tuyến tính đảm bảo cho quá trình định lượng với $R^2 > 0,99$. Mẫu

phân tích có hàm lượng kaempferol khoảng $98,3 \pm 2,01$ mg/g.

3.2. Kết quả thử độc tính cấp trên phôi cá ngựa vằn Danio rerio

Độc tính cấp của chế phẩm trà thảo dược được thể hiện ở hình 5. Nhìn chung, các mẫu sản phẩm

bột gây tử vong trên phôi cá ngựa vằn từ nồng độ 8.000 $\mu\text{g/mL}$ (tương đương pha loãng 1 gói sản phẩm thử nghiệm 10 g với 1.250 mL nước), đồng thời sản phẩm gây chậm quá trình phát triển của cá rõ rệt trong 48 giờ đầu và ức chế quá trình nở của phôi cá.



Hình 5. Đồ thị biểu thị ảnh hưởng của mẫu chế phẩm lên sự phát triển của phôi cá ngựa vằn

Hình 5 thể hiện ảnh hưởng của chế phẩm bột trà lên sức sống của phôi cá ngựa vằn trong 96 giờ thử nghiệm bằng 4 đường đại diện cho độc tính của chế phẩm bột trà ở lần lượt các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96 giờ thí nghiệm và sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Ở nồng độ 5.000 $\mu\text{g/mL}$, không quan sát được phôi chết trong giai đoạn 48 giờ đầu, sau 96 giờ sau phơi nhiễm, tỷ lệ phôi chết đạt xấp xỉ 38%. Với nồng độ 20.000 $\mu\text{g/mL}$, độc tính thể hiện rõ rệt từ ngay 24 giờ đầu và gây tử vong trên 100% ấu thể cá sau 96 giờ. Sau 96 giờ thí nghiệm, tỷ lệ tử vong của phôi cá ở các nồng độ 6.667; 8.000; 10.000 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt đạt 41%, 60% và 100%. Từ đồ thị hình 5 cho thấy, giá trị gây tử vong 50% lượng ấu thể (LC_{50}) ở thời điểm 96 giờ sau thử nghiệm là 6.817 $\mu\text{g/mL}$ tham chiếu với bảng 3 về phân loại độc tính thì sản phẩm bột trà không được xếp hạng và hầu như không có độc tính.

Một trong những quy tắc phối ngũ của y học phương Đông là việc kết hợp nhiều dược liệu với nhau để bào chế một sản phẩm với mục đích tăng tương tác, nâng công dụng và giảm thiểu độc tính là điều cần thiết. Lựa chọn phối hợp Thổ phục linh với Vẩy ốc theo tương tu có tác dụng tương hỗ nâng hiệu quả của nhau [11, 12], với mong muốn tăng cường khả năng kháng viêm, giảm đau. Tuy nhiên, Thổ phục linh lại rất hạn chế với người có chứng can thận âm hư, tỳ vị hư hàn. Do vậy, trong nghiên cứu này, chỉ bổ sung thêm một lượng nhỏ. Hiện tượng viêm chủ yếu là sự kích hoạt của hệ thống miễn dịch hoặc phản ứng enzyme. Ngoài việc bảo vệ hoạt động của các enzyme chống oxy hóa khác nhau, hoạt chất kaempferol còn được biết đến với vai trò là chất loại bỏ các gốc tự do và superoxide. Kaempferol có thể kích hoạt yếu tố hạt nhân kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) để điều chỉnh hoạt động chống viêm; kaempferol tăng cường khả năng thu dọn gốc tự do và kích hoạt sự tăng sinh tế bào T và điều chỉnh việc sản xuất oxit nitric (NO), hoặc các loại oxy phản ứng (ROS) trong các tế bào đại thực bào RAW 264,7 do lipopolysaccharit gây ra. Kaempferol làm giảm sự hình thành prostaglandin E2 và NO cũng như sự biểu hiện của synthase oxit cảm ứng và cyclooxygenase (COX)-2, cùng với sự ức chế thoái hóa $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ và $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, kaempferol còn có khả năng ức chế các cytokine gây viêm [22 - 31].

3.3. Kết quả khảo sát hàm lượng ẩm, độ tro, chỉ tiêu vi sinh vật của chế phẩm

Thành phẩm trà dược liệu Vẩy ốc được bảo quản trong túi nylon hàn kín, ở nhiệt độ không quá 30°C. Sản phẩm dạng bột có màu nâu sậm, vị ngọt nhẹ, thanh mát, mùi thơm của dược liệu và dễ uống khi pha trong nước nóng. Kết quả thực nghiệm xác định độ ẩm và độ tro được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả thử nghiệm độ ẩm và độ tro của trà Vẩy ốc

Chỉ tiêu	Đơn vị	Lần đo			Trung bình	SD (%)	RSD (%)	TCVN 9739:2013 [32]
		1	2	3				
Độ ẩm	%	3,26	3,22	3,19	3,22	0,01	0,31	6
Độ tro	%	11,27	11,32	11,26	11,28	0,03	0,26	20

Sản phẩm trà thảo dược thu được có độ ẩm phù hợp với TCVN 9739:2013 [32], yêu cầu có độ ẩm nhỏ hơn 6% và độ tro tổng số nhỏ hơn 20%, trung bình đạt 3,22% và độ tro đạt khoảng 11,28%,

Bảng 8. Kết quả đánh giá chỉ tiêu vi sinh vật của mẫu trà Vẩy ốc

STT	Chỉ tiêu thử nghiệm	Phương pháp phân tích	Kết quả	Đơn vị tính
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	TCVN 4884-1:2015 [16]	Không phát hiện (LOD=10)	CFU/g
2	<i>E. coli</i>	TCVN 7924-2:2008 [17]	Không phát hiện (LOD=10)	CFU/g
3	<i>Coliforms</i>	TCVN 6848:2007 [18]	Không phát hiện (LOD=10)	CFU/g
3	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	TCVN 8275-2:2010 [19]	Không phát hiện (LOD=10)	CFU/g

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật của mẫu trà thảo dược Vẩy ốc được thể hiện trong bảng 8. Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu vi sinh vật như tổng số, vi sinh vật hiếu khí, tổng số bào tử nấm men, nấm mốc, vi khuẩn *E. coli* và *Coliforms* có trong mẫu trà đều không phát hiện, ở dưới ngưỡng phát hiện (LOD = 10) được quy định trong các TCVN [16 - 19].

4. KẾT LUẬN

Từ dịch chiết Vẩy ốc đã phân lập ra hợp chất kaemferol, cấu trúc hợp chất được nhận biết bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$. Định lượng được hợp chất này trong thành phẩm bột trà $98,3 \pm 2,01$ mg/g. Thành phẩm trà thảo dược đã được khảo sát độc tính cấp theo hướng dẫn của OECD 236 trên phôi cá ngựa vằn, phép thử cho thấy, sản phẩm bước đầu khá an toàn bởi chỉ số đại độc tính LC_{50} là $6.817 \mu\text{g/mL}$; nồng độ an toàn theo kết quả thử độc LC_{10} là $4.064 \mu\text{g/mL}$, cùng các chỉ tiêu hóa lý như: Độ ẩm đạt 3,22%, độ tro trung bình khoảng 11,28%, các chỉ tiêu đều nằm trong giới hạn cho phép của TCVN 9741:2013, TCVN 9742:2013 và theo Dược điển Việt Nam V. Kết quả của nghiên cứu là tiền đề, mở ra các nghiên cứu sâu hơn trong việc sử dụng loài Vẩy ốc để điều trị chứng đau nhức xương khớp do viêm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội với đề tài mã số 19-2024-RD/HĐ-ĐHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2016). *Viêm khớp dạng thấp - Bệnh học Cơ xương khớp nội khoa*. Nxb Giáo dục Việt Nam.
- Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học.
- Leong Cheng Ning Abraham, Tako Masakuni, Hanashiro Isao, Tamaki Hajime (2008). Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L. *Food Chemistry*, Vol 109, pp. 415 – 420.
- Zhi-Yong Qi, Jia-Ying Zhao, Fang-Jun Lin, Wan-Lai Zhou, Ren-You Gan (2021). Bioactive Compounds, Therapeutic Activities and Applications of *Ficus pumila* L. *Agronomy*, Vol 11(1): 89. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010089>
- Wen-Lin Xiao, Wen-Hao Chen, Wei Li, Guang-Ying Chen, Xiao-Ping Song, Chang-Ri Han (2024). Chemical constituents from the stem of *Ficus pumila*. *Nat Prod Res*, Vol 38(3), pp. 408 – 414.
- Bai M, Cai Y, Wu SY, Song XP, Chen GY, Zheng CJ, Han CR. (2019). A new norisoprenoid

from the leaves of *Ficus pumila*. *National Product Research*, Vol 33(9), pp. 1292 – 1297.

7. Eitel Ngoh Misse Mouelle, Mohamed Foundikou Nsangou, Vanini Samiyatou Michiren Mandou, Jean Duplex Wansi, Sergi Herve Akone and Emmanuel Ngeufa Happi (2022). Chemical constituents from *Ficus sur* Forssk (Moraceae). *Zeitschrift fur Naturforschung*, Vol 3, 78(5 - 6), pp. 201 – 207.

8. Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., Rathee D., Kumar V., Kohli K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: A review. *Inflamm Allergy Drug Targets*, Vol 8(3), pp. 229 – 235.

9. Hao Wu, Yu Wang, Bing Zhang, Yao-lei Li, Zhi-xin Ren, Jing-jian Huang, Zhi-qi Zhang, Zhi-jian Lin and Xiao-meng Zhang (2022). *Smilax glabra* Roxb.: A Review of Its Traditional Usages, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties and Clinical Applications. *Drug Design, Development and Therapy*, Vol 16, pp. 3621 – 3643.

10. Fei Sa, Jian-Li Gao, Kwok-Pui Fung, Ying Zheng, Simon Ming-Yuen Lee, Yi-Tao Wang (2008). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines. *Chemico-Biological Interactions*. Vol 171, pp. 1 – 14.

11. Trần Văn Kỳ (2013). *Dược học cổ truyền*. Nxb Đà Nẵng.

12. Nguyễn Huy Công (2015). *Hóa dược - Dược lý*. Bộ Y tế - Nxb Y học.

13. Bộ Y tế (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nxb Y học.

14. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9741:2013. Chè hòa tan dạng rắn – Xác định độ ẩm (hao hụt khối lượng ở 103°C).

15. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9742:2013 (ISO 7514:1990). Chè hòa tan dạng rắn – Xác định tro tổng số.

16. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013). Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa.

17. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza - Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44°C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl β -D-glucuronid.

18. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Coliform* – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

19. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8275-2:2010 (ISO 21527-2:2008). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.

20. Vereinte Nationen (2021). Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), United Nations, New York Geneva.

21. S. Jarque, M. Rubio-Brotons, J. Ibarra, V. Ordoñez, S. Dyballa, R. Miñana, J. Terriente, Morphometric (2020). Analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. *Reproductive Toxicology*, Vol 96, pp. 337 - 348.

22. Pont M., Day A., Bennett R., Mellon F., Kroon P (2024). Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. *Eur. J. Clin. Nutr*, Vol 58(6): 947 - 54. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601916.

23. Seo EH, Kang J, Kim KH, Cho MC, Lee S, Kim HJ, *et al.* (2008). Detection of expressed IL-32 in human stomach cancer using ELISA and immunostaining. *J Microbiol Biotechnol*, Vol 18(9), pp. 1606 - 1612.

24. Rong Y, Xiang XD, Li YM, Peng ZY, Li JX. (2015). IL-32. was involved in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in COPD. *Clin Respir J*, Vol 9(4), pp. 430 - 435.

25. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, *et al.* (2015) Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res*, Vol 99, pp. 1 – 10.

26. Xie JH, Dong CJ, Nie SP, Li F, Wang ZJ, Shen MY, *et al.* (2015). Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. *Food Chem*, Vol 186, pp. 97 - 105.
27. Ibrahim RR, Ibrahim HA, Shabana SS, El-Hosari DG, Ali SA, Mahgoub S, *et al.* (2021). New phenolic compounds from *Calothamnus quadrifidus* R. Br. aerial parts and their antioxidant activity. *Nat Prod Res*, Vol 35(23), pp. 5183 - 5191.
28. Ghareeb MA, Saad AM, Abdou AM, Refahy LAG, Ahmed WS. (2016). A new kaempferol glycoside with antioxidant activity from *Chenopodium ambrosioides* growing in Egypt. *Orient J Chem*, Vol 32(6), pp. 3053 - 3061.
29. Simunkova M, Barbierikova Z, Jomova K, Hudecova L, Lauro P, Alwasel SH, *et al.* (2021). Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu(II) ions: A ROS-scavenging activity, Fenton reaction and DNA damage study. *Int J Mol Sci*, Vol 22(4), pp. 16 - 19.
30. Zang Y, Zhang D, Yu C, Jin C, Igarashi K. (2017). Antioxidant and hepatoprotective activity of kaempferol 3-O- β -D-(2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)galactopyranoside against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Food Sci Biotechnol*, Vol 26(4), pp. 1071 - 1076.
31. Al-Numair KS, Veeramani C, Alsaif MA, Chandramohan G. (2015). Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*, Vol 53(9), pp. 1372 - 1378.
32. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9739:2013 (ISO 6079:1990). Chè hòa tan dạng rắn - Yêu cầu.

RESEARCH FOR PREPARATION OF HERBAL TEA FROM *Ficus pumila* L. TO SUPPORTING TREATMENT OSTEOARTHRITIS

Le The Hoai¹, Nguyen Thi Thanh Mai¹, Nguyen Thi Hong Hanh²

¹Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry

²Faculty of Natural Resources and Environment, Vietnam National University of Agriculture

Summary

In this study, kaempferol compound (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) was found in the extract from *Ficus pumila* L. collected in Trung Khanh district, Cao Bang province. Kaempferol is a compound with anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer, antidiabetic and neuroprotective activities. On that basis, herbal tea is prepared from the ethanol-water extract of the *Ficus pumila* L. species combined with *Smilax glabra* Roxb - a medicine with diverse biological activities that helps reduce rheumatism and detoxify, reduces pain and inflammation, enhances tendon strength and support in osteoarthritis treatment. The medicinal substance kaempferol in the herbal tea product was quantified by using high-performance chromatography technique, with a content of about 98.3 ± 2.01 mg/g. The toxicity of the herbal tea product was surveyed on zebrafish embryos according to guidelines of OECD 236 organisation, the results show that the product is non-toxic. The herbal tea was determined with physicochemical criteria such as moisture of 3.22% and ash level of 11.28%, meeting the requirements according to TCVN 9739:2013 - National standard for Instant tea in solid form

Keywords: *Ficus pumila* L., herbal tea, kaempferol.

Ngày nhận bài: 20/3/2024

Ngày chuyển phản biện: 28/3/2024

Ngày thông qua phản biện: 15/4/2024

Ngày duyệt đăng: 30/5/2024