

HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT LÁ DÂY MỎ QUẠ (*Dischidia major*)

Đến tòa soạn 30-10-2019

Nguyễn Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Mai Thanh
Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF DISCHIDIA MAJOR LEAF

This research aimed to investigate the antioxidant activity of the aqueous, methanolic and ethanolic extracts of Dischidia major (Vahl) Merr. leaf by using different antioxidant models of screening such as the methods of DPPH, ABTS^{•+}, Reducing Power (RP), Ferric ions Reducing Ability Power (FRAP), phosphomolybdenum and nitric oxide. The results showed that the aqueous extract exhibited the best antioxidant activity in all extracts. In addition, the results of preliminary chemical constituents and total polyphenol and flavonoid contents showed that the aqueous extract contained lots of high bioactive components which fit with the best antioxidant activity of aqueous extract. The present study opens a new direction for using this plant in the medicinal field in the future.

Keywords: Antioxidant, *Dischidia major* (Vahl) Merr., flavonoid, polyphenol

1. MỞ ĐẦU

Dây Mỏ quạ (*Dischidia major* (Vahl) Merr.) là họ loại cây ở vùng nhiệt đới, phân bố ở Nam và Đông Nam châu Á như Ấn Độ, Malaysia, Campuchia, Thái Lan và Việt Nam. Ở Việt Nam, dây Mỏ quạ phân bố ở các tỉnh phía Nam, chưa thấy ở các tỉnh phía Bắc. Dây Mỏ quạ rất phổ biến trong y học cổ truyền và các bài thuốc dân gian, được dùng trong trị liệu chữa vết thương phần mềm, đau nhức chân tay, chữa ho, vàng da, rắn độc cắn. Lá hình túi được dùng để ngâm rượu, tác dụng khu phong, hoạt huyết, giảm đau rất hiệu quả cho các chứng tê thấp, đau lưng, nhức mỏi [1].

Trên thế giới, những nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Dischidia* còn hạn chế. Dây Mỏ quạ có chứa steroid glycoside và quinon [2]. Cao chiết ethanol của *Dischidia major* (Vahl) Merr. và dịch chiết từ hoa của nó có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh [3]. Dịch chiết nước của dây mỏ quạ có tác dụng kháng oxy hóa và ức chế tyrosinase cao [4]. Ở Việt Nam, chưa có công trình nào nghiên cứu về hoạt tính

sinh học của dây mỏ quạ cũng như thành phần hóa học của chúng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu

Dây Mỏ quạ được thu hái ở thành phố Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang vào tháng 5/2018, được định danh bởi Tiến sĩ Đặng Minh Quân, Bộ môn sư phạm Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Mẫu thực vật (KG_Dis 2018050002) được lưu giữ tại PTN. Sinh học thực vật, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Lá (hình bầu) của mẫu thực vật dùng làm thí nghiệm được rửa sạch, phơi khô và nghiền thành bột. Bột được trữ trong tủ đông -20°C cho đến khi thí nghiệm.

2.2. Điều chế cao chiết

Mẫu bột lá (900 g) của dây Mỏ quạ được chia thành ba phần, mỗi phần 300 g. Sau khi loại chất béo cả ba phần bằng hexan, phần thứ nhất và phần thứ hai được ngâm chiết với dung môi methanol, ethanol trong 24h trong bình thủy tinh. Quá trình ngâm chiết được thực hiện 5 lần cho mỗi dung môi. Phần thứ ba được chiết với nước nóng 5 lần. Sau đó tất cả dịch chiết được

lọc qua giấy lọc rồi tiến hành cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất thấp. Phần thứ nhất và thứ hai thu được cao chiết methanol (13,75 g) và cao ethanol (18,98 g) dạng cao sệt, phần thứ ba đông cô chân không thu được cao nước (16,15 g) dạng bột khô.

2.3. Định tính thành phần hóa học các cao chiết

Thành phần hóa học của các cao chiết như: alkaloid, flavonoid, steroid và triterpene, đường khử, saponin và tannin được định tính bằng các thuốc thử đặc trưng [5]

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết

Khảo sát hiệu quả loại bỏ gốc tự do DPPH

Khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của các cao chiết lá dây Mỏ quạ được thực hiện theo Sharma *et al.*, 2009 [6]. Hỗn hợp phản ứng gồm 40 μL DPPH (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và 960 μL cao nước (ở nồng độ từ 0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cao methanol (ở các nồng độ từ 0 - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cao ethanol (ở các nồng độ từ 0 - 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ủ trong tối 30°C trong thời gian 30 phút, đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm. Đối chứng dương sử dụng là vitamin C. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được biểu diễn bằng giá trị EC_{50} (Effective Concentration of 50%).

Khảo sát hiệu quả loại bỏ gốc tự do ABTS⁺

Hoạt động loại bỏ gốc tự do ABTS⁺ thực hiện theo Nenadis *et al.*, 2004 [7]. Chuẩn bị dung dịch ABTS⁺: 2 mL dung dịch ABTS 7 mM và 2 mL dung dịch $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,45 mM, ủ trong bóng tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol (khoảng 30 lần), điều chỉnh độ hấp thụ ở bước sóng 734 nm đến $0,7 \pm 0,05$. Tiến hành cho 990 μL ABTS⁺ vào 10 μL cao nước (ở nồng độ từ 0 - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cao methanol (ở các nồng độ từ 0 - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cao ethanol (ở các nồng độ từ 0 - 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Đối chứng dương được sử dụng là trolox. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được biểu diễn bằng giá trị EC_{50} (Effective Concentration of 50%).

Khảo sát năng lực khử (Reducing Power - RP)

Năng lực khử sắt (RP) được thực hiện theo phương pháp Ferreira *et al.*, 2007[8]. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL cao nước (ở nồng độ từ 0 - 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cao methanol (ở các nồng độ từ 0 - 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cao ethanol (ở các nồng độ từ 0 - 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0,5 mL đệm phosphate (0,2 M, pH = 6,6) và 0,5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%. Sau đó hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 0,5 mL CCl_3COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/ phút trong 10 phút. Nhẹ nhàng rút 0,5 mL cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL FeCl_3 0,1%, lắc đều. Đo độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 700 nm. Chất đối chứng dương sử dụng là butylated hydroxianisole (BHA). Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết ($\mu\text{g}/\text{mL}$) có giá trị OD = 0,5 ($\text{OD}_{0,5}$).

Khảo sát khả năng khử sắt (FRAP)

Khả năng khử sắt FRAP được thực hiện theo Benzie IF, Strain JJ, 1996 [9]. Tiến hành cho 10 μL cao nước (ở nồng độ từ 0 - 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cao methanol (ở các nồng độ từ 0 - 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cao ethanol (ở các nồng độ từ 0 - 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vào 990 μL dung dịch FRAP. Các hỗn hợp trên được ủ ở 37°C trong 10 phút, sau đó tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 593 nm. Đối chứng dương sử dụng là trolox. Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết ($\mu\text{g}/\text{mL}$) có giá trị OD = 0,5 ($\text{OD}_{0,5}$).

Phương pháp phosphomolybden

Phương pháp dựa trên sự khử của Mo(VI) về Mo(V) thể hiện qua sự tạo phức Mo(V) - Phosphate màu xanh lá ở pH acid (Prieto P *et al.*, 1999 [10]). Tiến hành cho 100 μL cao nước (ở nồng độ từ 9 - 73 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cao methanol (ở nồng độ từ 9 - 73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cao ethanol (ở nồng độ từ 45 - 273 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vào dung dịch phosphomolybden. Các hỗn hợp trên được ủ ở 95°C trong 90 phút, sau đó tiến hành đo giá trị độ hấp thụ quang ở bước sóng 695 nm. Đối chứng dương sử dụng là vitamin C. Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó

chất chuẩn hay cao chiết ($\mu\text{g/mL}$) có giá trị $\text{OD} = 0,5$ ($\text{OD}_{0,5}$).

Phương pháp nitric oxide

Phương pháp được thực hiện theo Govindarajan R *et al.*, 2003[11], có hiệu chỉnh: Lấy 1 ml dung dịch natri nitroprusside 5 mM trong dung dịch đệm phosphate được trộn với 0,5 ml cao chiết (cao nước 125 - 625 $\mu\text{g/mL}$, cao methanol 125 - 625 $\mu\text{g/mL}$, cao ethanol 167 - 833 $\mu\text{g/mL}$). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 25°C trong 120 phút. Sau 120 phút, rút 0,5 ml dung dịch ủ và trộn với 1,5 ml thuốc thử Griess (1% sulphanilamide, 2% acetic acid và 0,1% naphthyl ethylene diamine dihydrochloride). Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm. Chất

đối chứng là gallic acid. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được biểu diễn bằng giá trị EC_{50} (Effective Concentration of 50%).

2.5. Định lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong cao chiết

Hàm lượng polyphenol được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu theo mô tả của Rebaya *et al.* [12]. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao chiết được xác định theo phương pháp so màu AlCl_3 của Bag *et al.* [13].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định tính thành phần hóa học các cao chiết

Bảng 1: Kết quả định tính các hợp chất trong các cao chiết

Nhóm chức	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận		
			Cao nước	Cao methanol	Cao ethanol
Alkaloid	Wagner	Kết tủa nâu	+	+	+
	Mayer	Kết tủa trắng	-	+	+
Flavonoid	FeCl_3	Kết tủa nâu đỏ/ xanh đen	+	+	+
	H_2SO_4 đậm đặc	Kết tủa đỏ, vàng hay cam	+	+	+
	NaOH 1%/ethanol	Dung dịch vàng, cam- đỏ	+	+	+
Steroid và triterpenoid	Liebermann– Burchard	Dung dịch đỏ cam	-	+	+
	Salkowski	Dung dịch đỏ đậm	-	+	+
Đường khử	Tollens	Kết tủa Ag đen	+	+	+
	Fehling	Kết tủa đỏ gạch	+	+	+
Saponin	Tạo bọt với HCl 0,1N	Tạo cột bọt bền	-	-	-
	Tạo bọt với NaOH 0,1N	Tạo cột bọt bền	-	-	-
Tannin	Gelatin mẫn	Kết tủa bông trắng	+	+	+
	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$	Tủa trắng	+	+	+

Ghi chú: + dương tính, - âm tính

Kết quả định tính thành phần hóa học các cao chiết cho thấy sự có mặt của flavonoid, alkaloid, tannin, đường khử (glycoside). Ngoài ra, cao ethanol và methanol còn có steroid. Không có sự hiện diện saponin trong các cao. Nhóm chất flavonoid đã được biết đến là một

trong những polyphenol có hoạt tính kháng oxy hóa tốt. Từ việc định tính cho thấy trong lá dây Mỏ quạ chứa nhiều các nhóm hợp chất có tiềm năng sinh học.

3.2. Hoạt tính kháng oxy hóa

Bảng 2: Giá trị EC₅₀ (OD_{0,5}) của các cao chiết với các phương pháp kháng oxy hóa

Phương pháp (EC ₅₀ hay OD _{0,5})	Chất chuẩn	Cao nước	Cao methanol	Cao ethanol
DPPH	3,90±0,139	84,15±5,770	162,68±9,900	300,93±16,310
ABTS ⁺	7,01±0,020	37,86±0,657	37,93±0,566	70,13±1,046
Năng lực khử (RP)	34,56±0,327	525,19±3,640	944,42±17,300	3467,33±9,290
Khử sắt (FRAP)	2,07±0,045	23,85±0,172	32,94±0,215	91,25±1,150
Phosphomolybdeum	10,13±0,641	21,55±0,817	34,22±0,802	98,67±2,880
Nitic oxide	3,50±0,064	130,39±11,460	298,37±8,320	523,77±16,150

Ghi chú: Kết quả ± với độ lệch chuẩn của từng giá trị. Chất chuẩn trong cột theo thứ tự vitamin C, trolox, BHA, trolox, vitamin C, gallic acid.

Kết quả cho thấy rằng trong 6 phương pháp thì khả năng kháng oxy hóa của cao nước là hiệu quả nhất trong ba cao chiết với giá trị EC₅₀ hay OD_{0,5} thấp. Điều này cũng phù hợp với kết quả định tính thành phần hóa học và định lượng polyphenol, flavonoid cho thấy cao nước chứa các thành phần có hoạt tính sinh học cao hơn. Aktumsek *et al.*, 2013, cũng chỉ ra rằng khả năng kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH, ABTS⁺, năng lực khử (RP) của 3 loài *Centaurea* trong cao chiết nước tốt hơn so với cao ethanol, cao methanol, cao hexane và cao ethyl acetate [14]. Sahreen S *et al*, 2010, đối với phương pháp phosphomolybdenum thì khả năng khử Mo(VI) về Mo(V) của cao chiết nước (EC₅₀ = 206,18±2,4 µg/mL) của *Carissa opaca* fruits tốt hơn cao methanol (EC₅₀ =

228,46±3,5 µg/mL)[15]. Nghiên cứu của Osagie-Eweka, 2017, cũng cho thấy cao chiết từ *Simarouba glauca* có khả năng kháng oxy hóa theo thứ tự cao nước > cao methanol > cao ethanol (giá trị EC₅₀ lần lượt là 10,00 µg/mL, 11,90 µg/mL, 19,00 µg/mL)[16]. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước khi sử dụng dung môi nước sẽ cho hiệu quả kháng oxy hóa tốt nhất.

3.3. Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng

Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết được xác định tương đương hàm lượng gallic acid, quercetin với phương trình đường chuẩn $y = 0,1052x + 0,083$ (R² = 0,9999) và $y = 0,0053x + 0,0068$ (R² = 0,9923).

Bảng 3: Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng của các cao chiết

	Cao nước	Cao methanol	Cao ethanol
TPC (mg GAE/g cao chiết)	74,018±0,439	52,852±1,006	13,310±1,980
TFC (mg QE/g cao chiết)	280,126±1,089	253,080±2,880	178,110±2,500

Dung môi nước, methanol và ethanol đều là những dung môi có độ phân cực cao, có khả năng hòa tan được nhiều hợp chất có tính phân cực và kém phân cực. Nhưng dung môi nước phân cực hơn cả methanol và ethanol, do đó có khả năng hòa tan được nhiều hợp chất phân cực hoặc có tính ion như acid, rượu và muối dễ tan trong nước, nên cao chiết từ nước có hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng nhiều nhất trong ba cao khảo sát.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước đây. Theo nghiên cứu của Reddy *et*

al., 2012, cho thấy lá của *Leea indica* (họ Vitaceae) có hàm lượng hợp chất phenolic trong cao nước (37,29 ± 3,52 mg GAEs /g cao chiết) cao hơn cao ethanol tinh khiết (19,15 ± 2,66 mg GAEs /g chiết xuất)[17]. Nghiên cứu của Aktumsek *et al.*, 2012, cả 3 loài *Centaurea* cho thấy cao chiết từ nước có hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng cao hơn cao methanol tinh khiết [14]. Theo Nyirenda *et al.*, 2012, các hợp chất phân cực như hợp chất phenolic và flavonoid, hòa tan trong dung môi

nước nhiều hơn so với trong dung môi hữu cơ [18].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết lá dây mô quạ cho thấy dây Mô quạ cho hoạt tính kháng oxy hóa khá tốt, đặc biệt hiệu quả kháng oxy hóa của cao nước đều tốt hơn cao methanol và cao ethanol. Kết quả này cũng phù hợp với hàm lượng polyphenol và flavonoid trong cao nước cao hơn so với các cao còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Đỗ Huy Bích, 2004. Cây thuốc và động vật làm thuốc. Quyển 2. NXB Khoa học và kỹ thuật. Hà Nội. Trang 989-990.

[2] Wiart C, 2006. Medical plants of the Asia - Pacific: Drugs for the future?. World Scientific Publishing. 484-485.

[3] Manok S and Limcharoen P, 2015. Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-Hom Thepphachit. *Advanced Science*. 15(1): 106-117.

[4] Manosroi A, Jantrawut P, Manosroi J, 2008. Antioxidative and tyrosinase inhibition activities of extracts from Thai Lanna medicinal plants. *Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine*. 6(2): 137.

[5] Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Trang 80-138.

[6] Sharma OP, and Bhat TK, 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*. 113(4): 1202-1205.

[7] Nenadis N *et al.*, 2004. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS Assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4669-4674.

[8] Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M and Barros L, 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food chemistry*. 100(4): 1511-1516.

[9] Benzie IF, Strain JJ, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1): 70-76.

[10] Prieto P, Pineda M, Aguilar M, 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant

capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269(2): 337-341.

[11] Govindarajan R, Rastogi S, Vijayakumar M, 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 26: 1424-1427.

[12] Rebaya, A., Belghith S.I., Baghdikian B., Leddet V.M., Mabrouki F., Olivier E., Cherif J. K., Ayadi M.T., (2014). Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(1), 52-57.

[13] Bag, G.C., Devi P.G., Bhaigyabati T., (2015). Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 28, 154-159.

[14] Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A, 2013. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chemistry. Toxicol*. 55: 290-296.

[15] Sahreen S, Khan MR and Khan RA, 2008. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*. 122: 1205-1211.

[16] Osagie-Eweka SDE, 2017. Phytochemical analyses and comparative in vitro antioxidant studies of aqueous, methanol and ethanol stem bark extracts of *Simarouba glauca* DC. (Paradise tree). *African Journal of Plant Science*. 12(1): 7-16.

[17] Reddy NS, Navanesan S, Sinniah SK, Wahab NA, Sim KS, 2012. Phenolic content, antioxidant effect and cytotoxic activity of *Leea indica* leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 128-134.

[18] Nyirenda KK, Saka JDK, Naidoo D, Maharaj VJ, Muller CJF, 2012. Antidiabetic, anti-oxidant and antimicrobial activities of *Fadogia aencylantha* extracts from Malawi. *Journal of Ethnopharmacology* 143: 372-376.