

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN CHIẾT VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM *in vitro* CỦA CAO CHIẾT ETHANOL DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn) TRÊN MÔ HÌNH TẾ BÀO

Hoàng Thị Thu Thủy¹, Trần Hữu Thiện^{2,3}, Nguyễn Thị Ngọc Nhi⁴,
Ngô Đại Hùng⁴, Mạch Bảo Ngọc^{2,5}, Võ Thanh Sang^{2,3,*}

¹ Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên,
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

² Trung tâm Phát triển Công nghệ cao, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

³ Viện Khoa học Liên ngành, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

⁴ Trường Đại học Thủ Dầu Một

⁵ Viện Kỹ thuật CNC NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*Email: vtsang@ntt.edu.vn

TÓM TẮT

Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn) là dược liệu có tiềm năng kháng viêm nhờ chứa nhiều hợp chất polyphenol và các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học; tuy nhiên, hiệu quả thu nhận các thành phần này phụ thuộc vào điều kiện chiết xuất. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát điều kiện thích hợp để chiết xuất các hợp chất polyphenol từ Diệp hạ châu đắng bằng ethanol, đồng thời đánh giá hoạt tính kháng viêm của cao chiết thu được. Cao chiết được thu nhận bằng phương pháp ngâm ủ có gia nhiệt trong ethanol ở các điều kiện khác nhau để xác định thông số chiết thích hợp thông qua đo hàm lượng polyphenol tổng, đồng thời đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide (NO) và TNF- α trên dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bởi lipopolysaccharide (LPS). Kết quả cho thấy, điều kiện chiết thích hợp là ethanol 70°, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1: 8, ở 70°C trong 4 giờ, cho hàm lượng polyphenol tổng cao nhất (212,18 mg GAE/g cao chiết). Cao chiết thể hiện khả năng ức chế đáng kể lên sự sản sinh NO và TNF- α theo nồng độ. Nghiên cứu này chứng minh tiềm năng của cao chiết Diệp hạ châu đắng như một nguồn dược liệu tự nhiên có tác dụng kháng viêm và định hướng phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị viêm.

Từ khoá: Cây Diệp hạ châu đắng, kháng viêm, LPS, NO, TNF- α .

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là một cơ chế bảo vệ quan trọng giúp cơ thể loại bỏ yếu tố gây hại, loại bỏ tế bào bị tổn thương và khởi động quá trình sửa chữa mô [1]. Trong số các dược liệu được nghiên cứu, Diệp hạ châu đắng được quan tâm nhờ chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là nhóm polyphenol và các chất chuyển hóa thứ cấp liên quan đến tác dụng chống oxy hóa và kháng viêm [2]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, cao chiết từ Diệp hạ châu đắng có khả năng ức chế sự sản sinh NO, PGE₂ và TNF- α , đồng thời làm giảm biểu hiện iNOS, COX-2 và điều hòa các đường truyền tín hiệu viêm như NF- κ B và MAPK, qua đó khẳng định tiềm năng kháng viêm của loài dược liệu này [3, 4]. Những bằng chứng này cho thấy, Diệp hạ châu là nguồn nguyên liệu kháng viêm tự nhiên đầy tiềm năng. Tuy nhiên, hiệu quả chiết xuất các hợp chất có

hoạt tính sinh học của cao chiết dược liệu phụ thuộc chặt chẽ vào điều kiện trích ly, do các thông số như: Loại dung môi, nồng độ ethanol, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có thể ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu hồi và thành phần các hợp chất polyphenol. Nhiều nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất dược liệu đã chứng minh rằng, sự thay đổi các điều kiện này làm biến đổi rõ rệt hàm lượng polyphenol và hoạt tính sinh học của cao chiết [5].

Đối với Diệp hạ châu đắng, ảnh hưởng của các điều kiện trích ly lên hiệu quả thu nhận hợp chất polyphenol cũng cần được khảo sát, tạo bước tiền đề quan trọng trước khi đánh giá hoạt tính sinh học. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào được công bố trong nước liên quan đến việc khảo sát điều kiện tách chiết để thu nhận cao chiết giàu polyphenol từ Diệp hạ châu đắng. Bên cạnh đó, việc đánh giá tiềm năng kháng

viêm của Diệp hạ châu cũng chưa được công bố tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu về điều kiện tách chiết và hoạt tính kháng viêm của Diệp hạ châu ở Việt Nam là cần thiết, nhằm khẳng định tiềm năng dược liệu bản địa và góp phần phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị viêm có nguồn gốc tự nhiên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Nguyên liệu Diệp hạ châu đắng được thu hái vào tháng 4 năm 2024 tại phường Phú Lợi, Thành phố Hồ Chí Minh. Cây được thu hái vào buổi sáng, ở giai đoạn 2 tháng tuổi, với chiều cao trong khoảng 40 - 50 cm. Mẫu cây Diệp hạ châu đắng với tiêu bản mẫu có số hiệu PHH1004946 hiện đang được lưu trữ tại Bộ môn Sinh thái và Sinh học Tiến hóa (Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh). Sau khi thu hái, phân thân và lá (không bao gồm rễ) được rửa sạch, để ráo, sau đó sấy khô ở 60°C trong vòng 3 ngày. Mẫu khô được nghiền bằng máy nghiền dược liệu chuyên dụng, được rây qua rây với kích thước lỗ 1 mm, thu được bột có độ ẩm 6,8%, được sử dụng trực tiếp cho quy trình chiết xuất cao dược liệu.

2.2. Nuôi cấy tế bào và khảo sát độc tính tế bào

Dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung 10% huyết thanh bò thai (FBS) và 1% dung dịch kháng sinh Penicillin-Streptomycin (100 U/mL penicillin và 100 µg/mL streptomycin). Tế bào được duy trì trong tủ ẩm ở 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm bão hòa. Khi tế bào đạt khoảng 70 - 80% mật độ bám dính dưới đáy đĩa nuôi thì việc cấy chuyển sang đĩa nuôi cấy mới được thực hiện với sự hỗ trợ của trypsin-EDTA. Độc tính tế bào được khảo sát thông qua phương pháp MTT [6]. Tế bào RAW 264.7 được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 4×10^4 tế bào/ml và được xử lý với cao chiết ở các nồng độ 50 - 400 µg/ml (nồng độ cuối cùng) trong 24 giờ. Dung dịch nuôi cấy trong mỗi giếng sau đó được loại bỏ để thay thế bằng dung dịch MTT (1 mg/ml) và được ủ trong 4 giờ. Dung dịch MTT sau đó được loại bỏ để thay thế bằng 100 µl DMSO/giếng. Hỗn hợp sau khi được ủ trong 30 phút thì được đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm. Kết quả độc tính được đánh giá so với chứng âm không được xử lý cao chiết.

2.3. Chiết xuất cao chiết

Để xác định điều kiện thích hợp cho quá trình chiết xuất polyphenol từ dược liệu Diệp hạ châu đắng, nghiên cứu tiến hành khảo sát lần lượt các yếu tố ảnh hưởng chính bao gồm: Nồng độ ethanol (50°, 70° và 96°), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1: 8, 1: 10, 1: 15 và

1: 20), nhiệt độ chiết (50°C, 60°C, 70°C) và thời gian chiết (4, 8, 12, 24 giờ). Các khảo sát được thực hiện theo phương pháp đơn yếu tố; khảo sát được bắt đầu với nồng độ dung môi, trong khi các điều kiện khác được thiết lập cố định ở tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1: 8, nhiệt độ chiết 70°C trong thời gian 4 giờ. Tại mỗi yếu tố khảo sát, điều kiện thích hợp thể hiện ở hàm lượng polyphenol tổng cao nhất được được giữ cố định cho các khảo sát kế tiếp. Erlen có nút đậy bằng gỗ mềm được sử dụng trong quá trình tách chiết theo phương pháp ngâm chiết trong khoảng điều kiện khảo sát đã thiết lập. Quá trình chiết được lặp lại 4 lần. Hỗn hợp dịch chiết được cô đặc bằng hệ thống cô quay chân không. Cao đặc sẽ được làm khô đến độ ẩm đạt dưới 12% bằng tủ sấy ở nhiệt độ 60°C. Cao khô có độ thực tế là 10,6% được hòa tan lại trong ethanol 70° để pha các dung dịch thử nghiệm ở những nồng độ phù hợp cho các đánh giá hoạt tính sinh học tiếp theo.

2.4. Định lượng polyphenol tổng

Quy trình thực hiện: Lấy 0,5 mL dịch chiết mẫu, thêm 2,5 mL dung dịch Folin - Ciocalteu đã pha loãng (1: 10), để yên trong 5 phút. Sau đó thêm 2 mL dung dịch Na₂CO₃ 7,5% lắc đều và ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp tại bước sóng 765 nm bằng máy quang phổ UV - Vis [7]. Hàm lượng polyphenol được xác định từ đường chuẩn của axit gallic, biểu thị dưới dạng mg GAE/g cao chiết (GAE: Gallic acid equivalents). Việc hiệu chỉnh theo độ ẩm của cao chiết được thực hiện theo công thức:

$$\text{Hàm lượng polyphenol (mg GAE/g mẫu)} = \frac{C_{\text{mẫu}} \times V \times F}{m \times (1 - N) \times 1.000}$$

Trong đó: C_{mẫu} là nồng độ polyphenol tương đương axit gallic trong mẫu pha loãng (µg/mL); V là thể tích dung dịch mẫu gốc (mL); F là hệ số pha loãng; m là khối lượng mẫu cao chiết (g); N là độ ẩm mẫu cao chiết, dạng thập phân; 1.000 là hệ số chuyển đổi µg sang mg.

2.5. Phương pháp xác định hoạt tính ức chế sản sinh NO

Đại thực bào RAW 264.7 được cấy vào đĩa 96 giếng ở mật độ 5×10^4 tế bào/mL. Tế bào được xử lý với mẫu thử ở dải nồng độ (50 - 400 µg/mL) trong 24 giờ. Tế bào sau đó được xử lý với chất kích thích LPS (1 µg/mL) trong 6 giờ. Sau đó, hút 50 µl dịch nổi trong mỗi giếng trộn với 50 µl thuốc thử Griess. Hỗn hợp được duy trì trong tối khoảng 15 phút và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm [8]. Hàm lượng NO sản sinh được đánh giá qua công thức sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế NO (\%)} = [1 - (T - B)/(C - B)] \times 100$$

Trong đó: T là nhóm được xử lý với mẫu thử trước khi kích thích LPS; C là nhóm chỉ kích thích bởi LPS mà không được xử lý với mẫu thử; B là mẫu đối chứng (không được xử lý với cao chiết và LPS).

2.6. Phương pháp đo hàm lượng TNF- α

Đại thực bào RAW 264.7 được cấy vào đĩa 96 giếng ở mật độ 5×10^4 tế bào/mL. Tế bào được xử lý với mẫu thử ở dải nồng độ (50 - 300 $\mu\text{g/mL}$) trong 24 giờ. Tế bào sau đó được xử lý với chất kích thích LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) trong 12 giờ. Hàm lượng TNF- α được giải phóng vào môi trường nuôi cấy được định lượng bằng kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất do hãng Invitrogen cung cấp.

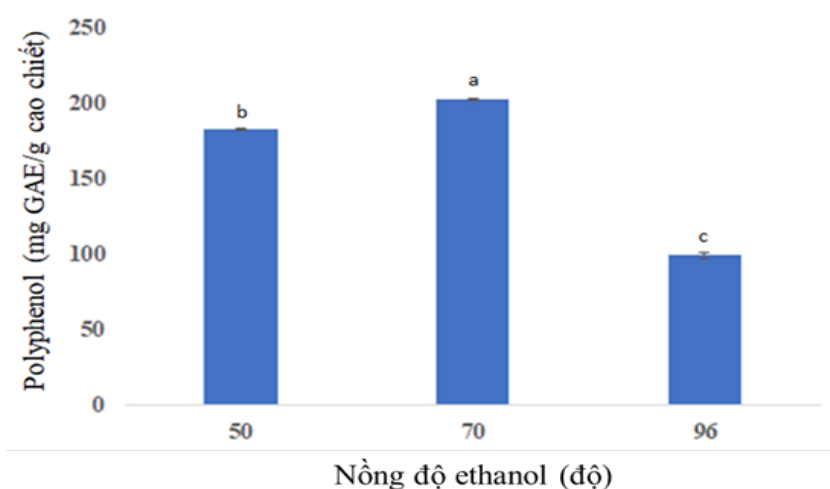
2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Các số liệu được xử lý trên phần mềm Excel, được trình bày dưới dạng mean $\pm$ SE. Dữ liệu được tính toán dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn, sau đó ANOVA và Turkey được phân tích bằng phần mềm SPSS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số

Kết quả đánh giá hàm lượng polyphenol tổng chiết xuất được đối với mỗi loại nồng độ ethanol được trình bày ở hình 1. Kết quả khảo sát cho thấy, hàm lượng polyphenol thay đổi rõ rệt theo nồng độ ethanol. Trong 3 mức khảo sát, ethanol 70° cho polyphenol tổng số là cao nhất, đạt mức $202,63 \pm 0,65$ mg GAE/g cao chiết. Như vậy, ethanol 70° cho hiệu quả thu nhận polyphenol tổng số cao nhất, cho thấy hỗn hợp ethanol - nước ở tỷ lệ này phù hợp hơn cho quá trình chiết xuất các hợp chất phenolic từ Diệp hạ châu. Hiệu quả này có thể được giải thích bởi tác động phối hợp của hai thành phần dung môi và nước giúp làm trương nở mô thực vật và tăng khả năng khuếch tán chất tan, trong khi ethanol hỗ trợ hòa tan các hợp chất phenolic. Do đó, hỗn hợp ethanol - nước thường cho hiệu quả chiết cao hơn so với ethanol tuyệt đối. Các khảo sát trên các đối tượng nghiên cứu khác như: *Trigonella foenum-graecum*, chè xanh, huyền sâm đỏ và húng quế cũng cho thấy, điều kiện chiết xuất 70 - 80° ethanol là tối ưu cho chiết polyphenol và hoạt tính sinh học [9, 10]. Từ kết quả này, ethanol 70° được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất.

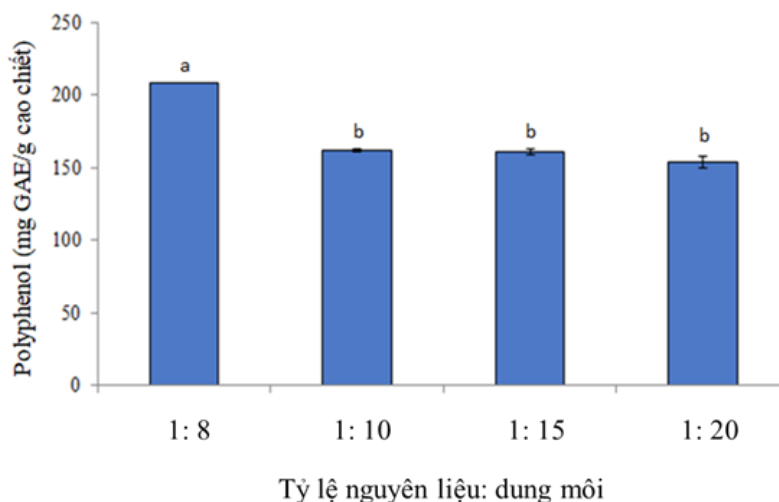


Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hiệu quả chiết xuất polyphenol tổng số

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - c) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.

Việc khảo sát tỷ lệ nguyên liệu: dung môi quyết định mức độ khuếch tán các hợp chất hoạt tính từ mô thực vật vào dung môi. Trong điều kiện cố định, ethanol 70°, nhiệt độ 70°C và thời gian 4 giờ, nghiên cứu khảo sát bốn tỷ lệ chiết gồm: 1: 8, 1: 10, 1: 15 và 1: 20. Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol chiết xuất tại mỗi loại tỷ lệ chiết được trình bày trong hình 2. Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1: 8 cho hàm lượng polyphenol tổng số cao nhất ($208,03 \pm 0,21$ mg

GAE/g cao chiết). Kết quả này cho thấy, lượng dung môi ở tỷ lệ 1: 8 đã đủ để thâm ướt nguyên liệu và hòa tan hiệu quả các hợp chất phenolic từ Diệp hạ châu. Việc tăng thêm thể tích dung môi không làm tăng tương ứng lượng polyphenol thu nhận, mà có thể làm tăng đồng chiết các thành phần không phenolic, dẫn đến giảm hàm lượng polyphenol tính trên đơn vị khối lượng cao chiết. Do đó, tỷ lệ 1: 8 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

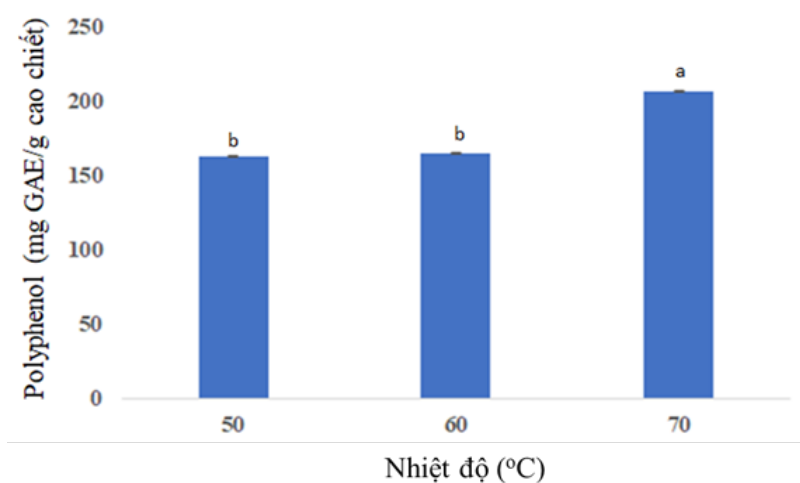


Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến hiệu quả chiết xuất polyphenol tổng số

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - b) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.

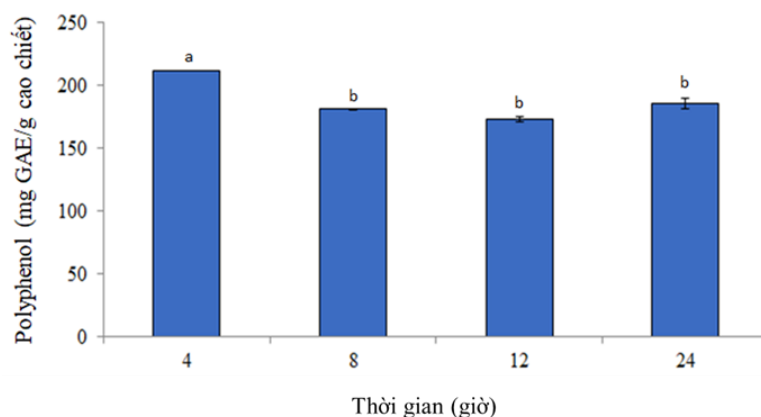
Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ khuếch tán, độ hòa tan và sự ổn định của hợp chất polyphenol trong dung môi chiết. Do đó, xác định được nhiệt độ chiết thích hợp giúp tăng hiệu suất thu hồi polyphenol, đồng thời bảo toàn cấu trúc và hoạt tính của các hợp chất tự nhiên trong nguyên liệu được chiết. Ở khảo sát này, điều kiện chiết ban đầu được cố định ở ethanol 70°, tỷ lệ 1: 8 và thời gian 4 giờ, trong khi nhiệt độ thay đổi ở các giá trị 50°C, 60°C và 70°C. Vì điều kiện chiết cao hơn 70°C sẽ gây bay hơi và cô cạn dung môi nên không thể thu nhận cao chiết, vì vậy dãy nhiệt độ cao hơn 70°C không được khảo sát. Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol tổng tại các mức nhiệt độ chiết được trình bày trong hình 3. Kết quả cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng polyphenol tổng số thu được. Khi tăng nhiệt độ từ 50 -

70°C, hàm lượng polyphenol tổng tăng lần lượt là 163,17; 165,66; 207,23 mg GAE/g cao chiết. Sự gia tăng này có thể được giải thích, do nhiệt độ cao giúp tăng tính thấm của màng tế bào, từ đó thúc đẩy quá trình khuếch tán hoạt chất ra dung môi. Ngoài ra, nhiệt độ 70°C cũng không làm phân hủy hoặc oxy hóa các hợp chất. Tương tự như vậy, kết quả nghiên cứu của Muhamad và cs (2014) [11] cũng xác nhận, điều kiện nhiệt độ 70°C cho hiệu suất chiết polyphenol và flavonoid cùng với hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất từ khế tàu. Ngoài ra, nhiệt độ 70°C cũng được đánh giá là nhiệt độ phù hợp cho việc lưu trữ các hợp chất polyphenols từ lá cây oliu [12]. Do đó, nhiệt độ 70°C được xác định là mức nhiệt thích hợp cho quá trình chiết hợp chất polyphenol.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu quả chiết xuất polyphenol tổng số

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - b) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.



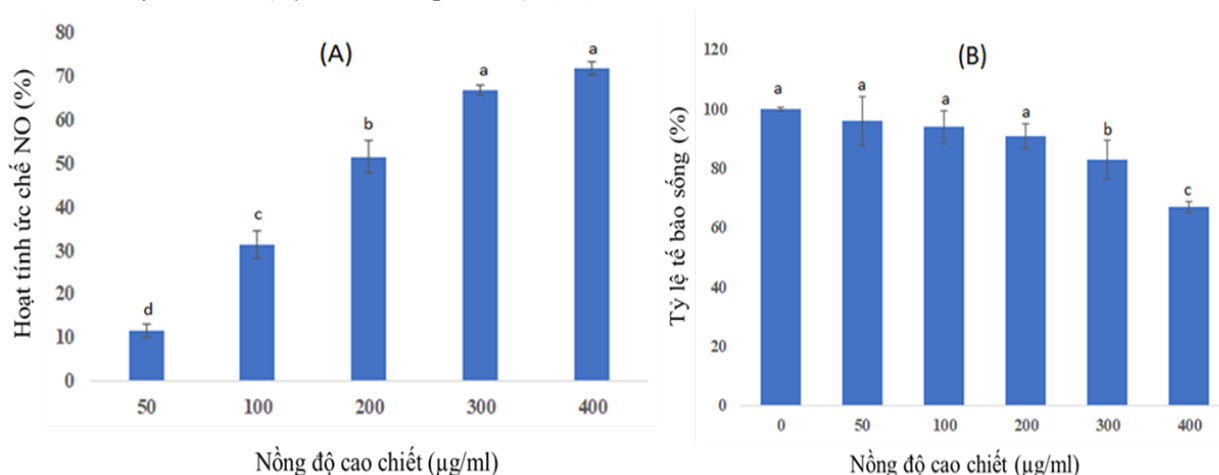
Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu quả chiết xuất polyphenol tổng số

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - b) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.

Trong nghiên cứu này, các khoảng thời gian được khảo sát gồm: 4, 8, 12, 24 giờ, với điều kiện cố định của ethanol 70°, nhiệt độ 70°C và tỷ lệ chiết 1: 8. Kết quả ở hình 4 cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng không tăng tuyến tính theo thời gian chiết. Giá trị cao nhất đạt được ở 4 giờ ($212,18 \pm 0,4$ mg GAE/g), sau đó giảm dần khi tăng thời gian chiết đến 24 giờ. Sự suy giảm sau 4 giờ có thể do hiện tượng oxy hóa hoặc phân hủy của hợp chất polyphenol khi thời gian chiết kéo dài. Ngoài ra, thời gian chiết quá lâu có thể dẫn đến hòa tan thêm các tạp chất không mong muốn, làm giảm độ tinh khiết của dịch chiết. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, thời gian chiết khoảng 4 giờ là thích hợp để thu hồi tối đa hàm lượng polyphenol tổng số mà vẫn đảm bảo ổn định cấu trúc hợp chất. Nghiên cứu của Engida và cs (2013) đã xác định thời gian chiết tối ưu là 4 giờ, cho hiệu suất và polyphenol tổng cao nhất từ cây ô kiền (*Myrmecodia pendan*) [13].

Tương tự, kết quả nghiên cứu của Rodriguez và cs (2017) [14] cũng ghi nhận, thời gian chiết 4 giờ cho hàm lượng flavonoid từ cây ô rô cạn (*Cirsium japonicum*) cao hơn rõ rệt so với 1 - 3 giờ. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Zhang và cs (2014) [15], theo đó điều kiện chiết là 70% ethanol, 58°C và 4 giờ là tối ưu cho hiệu suất chiết polyphenol. Những kết quả này cho thấy, thời gian chiết khoảng 4 giờ là mốc cân bằng giữa tốc độ khuếch tán hợp chất, giới hạn hòa tan và sự ổn định của polyphenol, được nhiều nghiên cứu xác nhận phù hợp cho chiết xuất polyphenol từ các dược liệu khác nhau. Từ kết quả này, thời gian 4 giờ được xác định là thích hợp, đảm bảo hiệu suất chiết cao đồng thời hạn chế rủi ro phân hủy hoạt chất.

3.2. Kết quả về hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide (NO)



Hình 5. Hoạt tính ức chế sản sinh NO (A) và khảo sát độc tính tế bào (B) của cao chiết Diệp hạ châu

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - d) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.

Nitric oxide (NO) được sản sinh quá mức bởi enzyme iNOS trong các tế bào đại thực bào trong đáp ứng viêm sẽ phản ứng với gốc tự do tạo thành

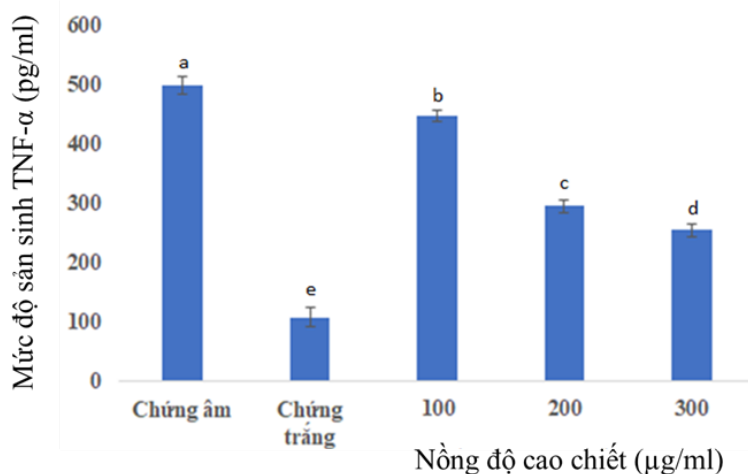
peroxynitrit, gây stress oxy hóa và làm tổn thương mô, góp phần làm trầm trọng thêm phản ứng viêm [16, 17]. Vì vậy, việc ức chế sự sản sinh NO là một

trong những tiêu chí quan trọng để đánh giá khả năng kháng viêm của các dược liệu. Kết quả khảo sát cho thấy, cao chiết Diệp hạ châu thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO phụ thuộc nồng độ (Hình 5A). Ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$, hoạt tính ức chế không đáng kể, nhưng tăng dần rõ rệt khi nồng độ cao chiết tăng đến 300 $\mu\text{g/mL}$, đạt mức ức chế khoảng 60 - 70%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 400 $\mu\text{g/mL}$, mức ức chế không thay đổi đáng kể so với 300 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy hiệu quả đạt trạng thái bão hòa. Bên cạnh đó, kết quả khảo sát độc tính tế bào của cao chiết Diệp hạ châu cho thấy, cao chiết không thể hiện độc tính ở dãy nồng độ 50 - 200 $\mu\text{g/mL}$, tuy nhiên độc tính bắt đầu thể hiện nhẹ ở nồng độ 300 $\mu\text{g/mL}$ và thể hiện độc tính rõ rệt ở nồng độ trên 300 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 5B). Kết quả này cho thấy, cao chiết Diệp hạ châu thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO nói riêng và các sản phẩm trung gian gây viêm nói chung có ý nghĩa ở khoảng nồng độ 50 - 300 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Kết quả về hoạt tính ức chế sản sinh TNF- α

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) là một cytokine tiền viêm chủ chốt, được tiết ra chủ yếu bởi các tế bào đại thực bào hoạt hóa trong giai đoạn đầu của phản ứng viêm. TNF- α đóng vai trò kích hoạt các

con đường tín hiệu như NF- κB và MAPK, thúc đẩy sự sản sinh các cytokine khác (IL-1 β , IL-6) và các enzyme gây viêm như COX-2 và iNOS. Tuy nhiên, sự tăng tiết quá mức TNF- α có thể dẫn đến rối loạn viêm, gây tổn thương mô và liên quan đến nhiều bệnh lý mạn tính như: Viêm khớp dạng thấp, viêm ruột và xơ vữa động mạch [18, 19]. Do đó, việc ức chế sản sinh TNF- α là một mục tiêu quan trọng trong đánh giá khả năng kháng viêm của các dược liệu. Kết quả khảo sát cho thấy, cao chiết Diệp hạ châu có khả năng ức chế đáng kể sự sản sinh TNF- α phụ thuộc vào nồng độ (Hình 6). Ở nhóm chứng âm (tế bào kích thích LPS nhưng không xử lý mẫu), mức TNF- α đạt khoảng 500 pg/mL, trong khi nhóm xử lý bằng cao chiết Diệp hạ châu, nồng độ TNF- α giảm dần xuống mức từ khoảng 450 pg/mL đến gần 300 pg/mL và 250 pg/mL ở nồng độ xử lý cao chiết lần lượt 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ và 300 $\mu\text{g/mL}$. Mức giảm này cho thấy, cao chiết Diệp hạ châu có tác dụng ức chế sản sinh TNF- α một cách rõ rệt và phụ thuộc liều, phản ánh khả năng điều hòa phản ứng viêm thông qua ức chế con đường tín hiệu liên quan đến NF- κB trong tế bào đại thực bào kích thích bởi LPS.



Hình 6. Hoạt tính ức chế sản sinh TNF- α bởi cao chiết Diệp hạ châu

Ghi chú: Các ký tự khác nhau (a - e) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê tại $p < 0,05$.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Các điều kiện chiết xuất như: Nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thu hồi hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết Diệp hạ châu đắng. Điều kiện trích ly thích hợp để thu nhận cao chiết ethanol giàu polyphenol từ Diệp hạ châu đắng trong nghiên cứu này gồm: Ethanol 70°, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1: 8, nhiệt độ 70°C và thời gian 4 giờ. Đồng thời, cao chiết còn cho thấy khả năng ức chế đáp ứng viêm thông qua làm yếu quá trình sản sinh các yếu tố

gây viêm như NO và TNF- α trong đại thực bào. Tuy nhiên, việc phân lập và định danh các hợp chất có hoạt tính kháng viêm chính trong cao chiết cũng là hướng nghiên cứu cần thiết nhằm xác định rõ thành phần tác dụng sinh học, góp phần chuẩn hóa và ứng dụng dược liệu Diệp hạ châu trong hỗ trợ kháng viêm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) dưới mã số 106.02-2021.43.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Soares C. L. R., Wilairatana P., Silva L. R., Moreira P. S., Vilar Barbosa N. M. M., da Silva P. R., Coutinho H. D. M., de Menezes I. R. A. and Felipe C. F. B. (2023). Biochemical aspects of the inflammatory process: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168: 115764. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115764.
2. Nisar M. F., He J., Ahmed A., Yang Y., Li M. and Wan C. (2018). Chemical components and biological activities of the genus *Phyllanthus*: A review of the recent literature. *Molecules*, 23: 2567. DOI: 10.3390/molecules23102567.
3. Kierner A. K., Hartung T., Huber C. and Vollmar A. M. (2003). *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF- κ B pathway. *Journal of Hepatology*, 38(3): 289 - 297. DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00417-8.
4. Hari Krishnan H., Jantan I., Haque M. A. and Kumolosasi E. (2018). Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. through inhibition of NF- κ B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1): 224. DOI: 10.1186/s12906-018-2289-3.
5. Che Sulaiman I. S., Basri M., Fard Masoumi H. R., Chee W. J., Ashari S. E. and Ismail M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemical Central Journal*, 11(1): 54. DOI: 10.1186/s13065-017-0285-1.
6. Nguyễn Thị Ngọc Quyên, Nguyễn Trung Quân, Hoàng Thành Chí, Bùi Thị Kim Lý (2023). Đánh giá tác động gây độc tế bào ung thư biểu mô gan và hoạt tính kháng oxi hoá của cao chiết lá cúc tần *Pluchea indica* (L.) LESS. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 21, 69 - 72.
7. Huỳnh Ngọc Trung Dũng, Hà Đăng Huy, Nguyễn Ngọc An, Nguyễn Phú Quý, Phạm Đoàn Vi (2022). Khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính sinh học của cao chiết từ vỏ chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 58, 74 - 82.
8. Nguyễn Thúc Thu Hương, Hoàng Nam Nhật, Trần Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Hồng, Phan Hồng Minh, Mai Phương Thanh (2025). Hoạt tính chống viêm *in vitro* và *in vivo* của cao chiết ethyl acetate từ vỏ thân cây núc nác (*Oroxylum indicum*). *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 194, 527 - 537.
9. Lohvina H., Sándor M. and Wink M. (2022). Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by HPLC-ESI-MS. *Diversity*, 14(1): 7. DOI: 10.3390/d14010007.
10. Brindha T., Rathinam R., Dheenadhayalan S. and Malarvizhi M. (2022). Extraction of polyphenols from green tea - HPLC purification of catechin fractions. *AIP Conference Proceedings*, 2446: 100006. DOI: 10.1063/5.0108679.
11. Muhamad N., Muhmed S. A., Yusoff M. M. and Gimbin J. (2014). Influence of solvent polarity and conditions on extraction of antioxidant, flavonoids and phenolic content from *Averrhoa bilimbi*. *Journal of Food Science and Engineering*, 4(5): 255 - 260. DOI: 10.17265/2159-5828/2014.05.006.
12. Markhali F. S. and Teixeira J. A. (2024). Effect of storage, temperature, and pH on the preservation of the oleuropein content of olive leaf extracts. *Sustainable Food Technology*, 2, 750 - 759. DOI: 10.1039/D4FB00044G.
13. Engida A. M., Kasim N. S., Tsigie Y. A., Ismadji S., Huynh L. H. and Ju Y. H. (2013). Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Industrial Crops and Products*, 41, 392 - 396. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.043.
14. Rodriguez J. P., Lee J., Park J. Y. and Lee S. H. (2017). HPLC-UV analysis of sample preparation influence on flavonoid yield from *Cirsium japonicum* var. *maackii*. *Applied Biological Chemistry*, 60, 519 - 525. DOI: 10.1007/s13765-017-0306-8.
15. Zhang W. M., Huang W. Y., Chen W. X., Han L. and Zhang H. D. (2014). Optimization of extraction conditions of areca seed polyphenols and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules*, 19(10): 16416 - 16427. DOI: 10.3390/molecules191016416.
16. Bogdan C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10): 907 - 916. DOI: 10.1038/ni1001-907.
17. Coleman J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1(8): 1397 - 1406. DOI: 10.1016/S1567-5769(01)00086-8.
18. Bradley J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2): 149 - 160. DOI: 10.1002/path.2287.

19. Aggarwal B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3(9): 745 - 756. DOI: 10.1038/nri1184.

INVESTIGATION OF EXTRACTION CONDITIONS AND *in vitro* ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. ON A CELL MODEL

**Hoang Thi Thu Thuy¹, Tran Huu Thien^{2,3}, Nguyen Thi Ngoc Nhi⁴,
Ngo Dai Hung⁴, Mach Bao Ngoc^{2,5}, Vo Thanh Sang^{3,4}**

¹ Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh National University

² Center for Hi-Tech Development, Nguyen Tat Thanh University

³ Interdisciplinary Science Institute, Nguyen Tat Thanh University

⁴ Thu Dau Mot University

⁵ NTT High-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

Abstract

Phyllanthus amarus is a medicinal herb with promising anti-inflammatory potential due to its rich content of polyphenols and other bioactive secondary metabolites; however, the recovery of these constituents is strongly influenced by extraction conditions. This study was conducted to determine the appropriate conditions for extracting polyphenolic compounds from *P. amarus* using ethanol and to evaluate the anti-inflammatory activity of the resulting extract. The extract was obtained by heat-assisted maceration in ethanol under different extraction conditions and the optimal parameters were determined based on total polyphenol content. The anti-inflammatory activity of the extract was further assessed through its inhibitory effects on nitric oxide (NO) and TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. The results showed that the optimal extraction conditions were 70% ethanol, a material-to-solvent ratio of 1: 8, at 70°C for 4 h, yielding the highest total polyphenol content (212.18 mg GAE/g extract). The extract significantly inhibited NO and TNF- α production in a concentration-dependent manner. These findings demonstrate the potential of *P. amarus* extract as a natural anti-inflammatory source and provide a basis for the development of herbal products supporting inflammation management.

Keywords: *Phyllanthus amarus*, anti-inflammation, LPS, NO, TNF- α .

Ngày nhận bài: 20/11/2025

Ngày chuyển phản biện: 28/11/2025

Ngày thông qua phản biện: 19/12/2025

Ngày duyệt đăng: 10/3/2026