

ẢNH HƯỞNG CỦA DUNG MÔI TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG FLAVONOID, POLYPHENOL, HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ SẢN SINH NITRIC OXIDE CỦA CAO CHIẾT RAU MÁ

Cao Thị Huệ¹, Hà Thị Dung², Nguyễn Thị Lan Hương^{1*}

¹ Trường Đại học Thủy lợi

² Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: huongntl@thu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số, hoạt tính kháng oxy hóa cũng như kháng viêm ức chế sản sinh nitric oxide (NO) của cao chiết rau má. Các loại dung môi: cồn thực phẩm 90° (ethanol), hỗn hợp ethanol/nước theo các tỉ lệ: 7: 3, 5: 5 và 3: 7 được lựa chọn để trích ly thu được các cao chiết tương ứng CA-E100, CA-EW73, CA-EW55, CA-EW37. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết CA-EW73 chứa hàm lượng polyphenol tổng số cao nhất, với giá trị 112,29 mg QE/g, trong khi cao chiết CA-E100 có hàm lượng flavonoid cao nhất, đạt giá trị 55,51 mg GAE/g. Cao chiết CA-EW73 thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp phosphomolybdateum và DPPH cũng như khả năng ức chế sản sinh NO tốt nhất, với giá trị EC₅₀ của các phép thử này đạt giá trị: 67,03; 63,98; 50,29 µg/mL. Kết quả khảo sát mở ra hướng lựa chọn dung môi phù hợp trong phát triển các sản phẩm kháng oxy hóa và ức chế sản sinh NO tự nhiên từ cây rau má.

Từ khóa: *Centella asiatica*, dung môi chiết xuất, hoạt tính kháng oxy hóa, ức chế sản sinh NO.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây rau má có tên khoa học là *Centella asiatica* (L.) Urb., thuộc họ Hoa tán (Apiaceae). Cây được phân bố rộng khắp ở các quốc gia Đông Nam Á, Trung Quốc, Ấn Độ, Sri Lanka, châu Đại Dương và châu Phi. Ở Việt Nam, rau má được phân bố khắp nơi từ vùng núi cao, hải đảo, các tỉnh đồng bằng và ven biển [1], [2]. Rau má là loại cây rất quen thuộc và được người dân sử dụng làm rau để ăn hoặc xay lấy nước uống giúp thanh nhiệt, giải độc, đồng thời loài cây này cũng được biết đến có khả năng điều trị nhiều loại bệnh [1 - 3].

Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của cây rau má. Các nhóm hợp chất đã được tìm thấy trong cây rau má bao gồm: Saponin triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tinh dầu và axit béo [1], [4], [5]. Một số nghiên cứu cho thấy cây rau má chứa các hợp chất triterpenoid như: α -humulene, β -caryophyllene và

bicyclogermacrene caryophyllene, farnesol và một số hợp chất khác [6 - 7]. Theo Azerad và cs (2016) [8], trong cây rau má còn có mặt của nhiều hợp chất như: Arjunolic axit, asiaticoside A - G, centellasaponin A-D, centellasapogenol A, centelloside A - D, quadranoside, scheffufuroside.

Cây rau má được biết đến có nhiều hoạt tính dược lý đáng chú ý như: Làm lành vết thương, vết loét dạ dày, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, tác dụng trên hệ thần kinh trung ương [2]. Các tác dụng sinh học chính của rau má được cho là do các saponin triterpenoid chiếm ưu thế, đặc biệt là asiaticosid, madecassosid, axit asiatic và axit madecassic [3]; các hợp chất phenolic và flavonoid cũng được chứng minh là có hoạt tính sinh học, cụ thể là chống lại độc tính thần kinh và các rối loạn liên quan đến stress oxy hóa. Cây rau má cũng được chứng minh có khả năng tăng cường hấp thụ và tái tạo collagen, giúp cải thiện quá trình chữa

lành vết thương nhỏ, sẹo phì đại và bỏng [3], [9]. Một số tác dụng dược lý khác như: Bảo vệ tim mạch, chống xơ vữa động mạch, hạ huyết áp, hạ lipid máu, chống đái tháo đường, kháng oxy hóa và chống viêm cũng được công bố [10 - 11]. Tác dụng kháng viêm *in vitro* được thể hiện qua khả năng ức chế sản sinh NO. Năm 2004, kết quả nghiên cứu của Guo và cs (2024) [12] cho thấy, cao chiết nước của rau má và hoạt chất asiaticoside có tác dụng ức chế sản sinh NO và do đó tạo điều kiện cho vết loét dạ dày nhanh lành. Nghiên cứu khác của Azis và cs (2017)[13] cho thấy, bôi cao phân đoạn giàu asiaticoside có khả năng làm lành vết thương trên thỏ.

Như vậy, có thể thấy, mặc dù cây rau má đã được biết tới từ rất lâu nhưng hiện nay vẫn có nhiều công trình về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài cây này tiếp tục được cập nhật. Ngoài ra, thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây rau má có thể phụ thuộc vào mùa vụ thu hái và địa điểm thu hái, điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng cũng như dung môi và điều kiện trích ly. Chính vì vậy, để góp phần cung cấp thêm những cơ sở tiền đề cho việc nhận biết và sử dụng có hiệu quả cây rau má để bào chế thuốc hoặc thực phẩm chức năng ở Việt Nam, nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi trích ly đến thành phần hóa học, hàm lượng flavonoid, polyphenol, hoạt tính kháng oxy hóa và khả năng ức chế sản sinh NO của cao chiết rau má là cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Mẫu cây rau má được thu hái tại bờ ven sông Hồng thuộc thôn Sâm Hồng, xã Thắng Lợi, huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên vào tháng 11 năm 2023. Mẫu phân trên mặt đất của cây rau má được thu hái, rửa sạch, sấy trong bóng râm ở nhiệt độ dưới 50°C đến khi mẫu đạt độ khô có thể xay được, sau đó tiến hành xay thành bột mịn và bảo quản trong các túi nilong có khóa zip và đặt ở vị trí khô thoáng, nhiệt độ dưới 35°C, tránh ánh nắng trực tiếp.

2.2. Xác định độ ẩm của bột dược liệu rau má

Độ ẩm của bột rau má được xác định dựa trên phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 100 - 105°C [14].

2.3. Quy trình tách chiết cao thô từ cây rau má

Nhằm mục đích ứng dụng các cao chiết để bào chế trong các giai đoạn tiếp theo, bột rau má nghiền nhỏ được trích ly bằng các hệ dung môi có nồng độ cồn khác nhau: Dung môi cồn thực phẩm 90° (100%), dung môi cồn - nước theo các tỉ lệ 7: 3, 5: 5 và 3: 7. Quá trình trích ly với mỗi loại dung môi được thực hiện lặp lại ba lần theo mô tả của Cao và cs (2022) [15], cụ thể như sau: Nhiệt độ 50°C, thời gian 45 phút/lần. Dịch chiết của ba lần được lọc bỏ cặn và gom lại, cô quay đuổi dung môi thu được cao chiết khô. Các cao chiết với dung môi cồn 100%, cồn - nước theo tỉ lệ 7: 3, 5: 5 và 3: 7 có kí hiệu tương ứng là: CA-E100, CA-EW73, CA-EW55, CA-EW37. Hiệu suất thu hồi cao chiết được tính theo công thức (1):

$$H, \% = \frac{\text{Khối lượng cao chiết thô}}{\text{khối lượng bột rau má khô ban đầu}} \quad (1)$$

2.4. Định tính sự có mặt của các hợp chất hữu cơ có trong các cao chiết

Định tính sự có mặt của các hợp chất sinh học: phenolic, flavonoid, carotenoid và terpenoid, coumarin và saponin được thực hiện theo phương pháp của Yadav và cs (2011) [16]. Tất cả các thí nghiệm định tính được thực hiện ba lần, mẫu đối chứng là cao chiết được pha với dung môi và không sử dụng các loại thuốc thử.

2.5. Định lượng flavonoid tổng số của các cao chiết

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Chang và cs (2002) [17] có cải tiến. Các mẫu cao chiết được pha trong ethanol đạt nồng độ 1 mg/mL. Quercetin được sử dụng để xây dựng đường chuẩn với dải nồng độ 20 - 120 µg/mL. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL dung dịch quercetin và 1,5 mL ethanol và để ổn định trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung thêm 0,1 mL $AlCl_3$ nồng độ 10% và để phản ứng trong 5 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được bổ sung thêm 0,1 mL CH_3COOK nồng độ 1 M và 2,8 mL nước cất, lắc đều, để ổn định thời gian 45 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu quercetin ở các nồng độ khác nhau được tiến hành đo quang phổ hấp thụ tại 415 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác

định hàm lượng flavonoid tổng số trong mẫu. Các cao chiết được tiến hành tương tự với quercetin. Kết quả được thể hiện bằng đường lượng quercetin trên gam cao chiết.

2.6. Định lượng polyphenol tổng số của các cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu và axit gallic được dùng để xây dựng đường chuẩn [18]. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL dung dịch polyphenol chuẩn ở các nồng độ pha loãng khác nhau 20 - 120 µg/mL và 0,1 mL thuốc thử Folin - Ciocalteu nồng độ 0,5 N, lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng, thời gian là 15 phút. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung thêm 2,5 mL dung dịch Na₂CO₃ bão hòa, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng và đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng polyphenol tổng trong các cao chiết. Các mẫu cao chiết được pha loãng bằng ethanol để đạt nồng độ 1 mg/mL và lặp lại tương tự đối với chất chuẩn gallic axit. Kết quả hàm lượng polyphenol tổng số được thể hiện bằng đường lượng gallic axit trên số gam cao chiết.

2.7. Đánh giá hoạt tính oxy hóa tổng theo phương pháp phosphomolybdateum

Pha loãng bốn cao chiết để đạt nồng độ 10 - 100 µg/mL. Lần lượt cho 0,1 mL mỗi dung dịch cao chiết pha loãng với nồng độ tương ứng ở trên vào ống eppendorf dung tích 2 mL, bổ sung thêm 1 mL dung dịch phản ứng (0,6 M H₂SO₄, 28 mM sodium phosphate và 4 mM ammonium molybdate). Ống eppendorff được đóng nắp chặt, sau đó được ủ ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 90 phút. Ống mẫu thí nghiệm được làm nguội tới nhiệt độ phòng, sau đó đo nồng độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm [18]. Ascorbic axit được dùng làm chất chuẩn. Hoạt tính chống oxy hóa tổng được tính theo công thức (2):

$$TAA, \% = (Ac - As) / Ac \times 100 \quad (2)$$

Trong đó: TAA là khả năng chống oxy hóa tổng, %; Ac và As là mật độ quang của dung dịch control và dung dịch mẫu thử. Dựa vào các giá trị

TAA, % thu được tại các nồng độ mẫu khác nhau, xác định được giá trị EC₅₀.

2.8. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp quét gốc tự do DPPH

Gốc tự do DPPH được sử dụng để xác định hoạt tính ức chế gốc tự do của các mẫu cao chiết. Phương pháp đánh giá được tiến hành như sau: Thêm 1,5 mL dung dịch DPPH 0,1 mM vào 1,5 mL dung dịch các mẫu CA-EW100, CA-EW73, CA-EW55, CA-EW37 lần lượt có nồng độ 10, 25, 50, 100 µg/mL trong ethanol 90%. Sau đó, ủ dung dịch trong bóng tối trong khoảng thời gian 30 phút, đo độ hấp thụ quang tại 517 nm. Các mẫu có hoạt tính mạnh, ức chế trên 50% tại nồng độ 10 µg/mL, được tiếp tục tiến hành ở các nồng độ thấp hơn là 1, 2, 5 µg/mL. Tất cả thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Hoạt tính ức chế gốc tự do DPPH (I%) được tính toán theo công thức tương tự đối với công thức (2). Quercetin được sử dụng làm chất đối chứng dương tại các nồng độ 10, 5, 2, 1 µM trong ethanol 90% [19].

2.9. Đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế NO trên mô hình tế bào RAW 264.7 được cảm ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS). Bước 1, tiến hành đánh thức tế bào RAW 264.7 từ nitơ lỏng. Tiếp theo, tế bào RAW 264.7 được nuôi trong môi trường DMEM bổ sung 2 mM L-glutamine, 10 mM dung dịch đệm HEPES, 1 mM sodium pyruvate và 10% fetal bovine serum (FBS), để trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau 3 - 5 ngày, tùy theo tình trạng tế bào sau khi đánh thức, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ 1: 3. Sau đó, tế bào được cấy chuyển vào trong đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/giếng, nuôi trong 24 giờ trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó tiến hành hút bỏ môi trường cũ và thay bằng môi trường mới DMEM không có FBS để trong 3 giờ. Tiếp theo, thay môi trường cũ bằng môi trường có chứa mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau và ủ trong 2 giờ. Môi trường của một số giếng không chứa mẫu nghiên cứu mà chỉ có dung dịch pha mẫu được gọi là đối chứng âm. Đối chứng dương được sử dụng là dexamethasone ở các nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 µM. Tiến hành kích thích sản sinh NO bằng LPS

nồng độ 1 µg/mL trong 24 giờ. Sau đó, hút 100 µL dịch nổi trong mỗi giếng sang đĩa 96 giếng mới và bổ sung 100 µL thuốc thử Griess reagent và ủ tiếp hỗn hợp trên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau đó, đo OD bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không có FBS được sử dụng làm giếng trắng (blank) [20]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị EC₅₀ được tính toán bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Xử lý số liệu và phân tích thống kê.

Tất cả các thí nghiệm và phép đo trong nghiên cứu đều được thực hiện 3 lần. Số liệu được xử lý và

phân tích sử dụng phần mềm Graphpad. Số liệu trong nghiên cứu này được trình bày dưới dạng giá trị trung bình phương sai (SD).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Độ ẩm của bột dược liệu và hiệu suất trích ly

Nghiên cứu này đã đánh giá độ ẩm của bột dược liệu và tiến hành tạo 4 cao chiết: cao chiết cồn 90° (100%), cao chiết cồn - nước theo tỉ lệ 7: 3, cao chiết cồn - nước theo tỉ lệ 5: 5, cao chiết cồn - nước theo tỉ lệ 3: 7.

Bảng 1. Hiệu suất trích ly các cao chiết từ cây rau má

Các cao chiết	Cồn 100%	Cồn - nước 7/3	Cồn - nước 5/5	Cồn - nước 3/7
Kí hiệu	CA-EW100	CA-EW73	CA-EW55	CA-EW37
Hiệu suất, %	9,23 ± 0,25	7,82 ± 0,54	6,54 ± 0,45	5,23 ± 0,32

Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu bột dược liệu sau khi xử lý có độ ẩm là 9,8 ± 0,2% cho thấy phương pháp xử lý mẫu để thu bột dược liệu khô là hợp lý; độ ẩm 9,8% hoàn toàn đáp ứng theo Dược điển Việt Nam (2017) [21] và có thể được dùng để tiến hành các thực nghiệm liên quan tới xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học và sâu hơn là để bào chế các loại dược phẩm, thực phẩm chức năng và thực phẩm thuốc phục vụ chăm sóc sức khỏe con người.

Bảng 1 cho thấy, các mẫu cao chiết thô CA-EW100, CA-EW73, CA-EW55, CA-EW37 đạt hiệu suất tương ứng: 9,23; 7,82; 6,54; 5,23%. Như vậy, có thể thấy, cao chiết chứa tỉ lệ cồn càng cao thì khả năng chiết rút các chất có chứa trong dược liệu

càng tốt. Nước là dung môi có độ phân cực cao hơn so với cồn.

Tuy nhiên, cồn được coi là dung môi vạn năng, có thể chiết cả các hợp chất kém phân cực, phân cực trung bình và phân cực cao. Hiệu quả của việc chiết xuất và trích ly các hợp chất phenolic bằng hỗn hợp dung môi cồn/nước so với chỉ sử dụng nước cũng được chứng minh bởi Ho Van Ba và cs (2017) [22]. Tuy nhiên, để định hướng việc sử dụng cao chiết trong việc bào chế dược phẩm cần phải sàng lọc thành phần hóa học, đặc biệt là hoạt tính sinh học, lựa chọn các cao chiết không chỉ tốt về hiệu suất, mà có hoạt tính và thành phần hóa học tốt nhất.

3.2. Kết quả định tính sự có mặt của các chất có trong cao chiết rau má

Bảng 2. Kết quả định tính sự có mặt của các hợp chất có trong cao chiết rau má

Tên nhóm chất	AC-E100	AC-EW73	AC-EW55	AC-EW37	Mẫu đối chứng
Polyphenol	++	++	+	+	-
Flavonoid	++	++	+	+	-
Terpenoid	+	+	-	-	-
Coumarin	-	+	+	+	-
Saponin	+	+	-	-	-
Carotenoid	+	+	+	+	-

Ghi chú: “+”: Có, “-”: Không; các kí hiệu: “+”, “++”, “+++” thể hiện cường độ trung bình/mạnh của nhóm chất chứa trong cao chiết.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của dung môi sử dụng đến sự xuất hiện của các nhóm chất có chứa trong cao chiết. Trong tất cả cao chiết đều có sự xuất hiện của nhóm chất: polyphenol, flavonoid, carotenoid. Trong đó, cao chiết cồn CA-E100, CA-EW73, sự xuất hiện của 2 nhóm chất polyphenol và flavonoid có cường độ mạnh nhất. Nhóm chất terpenoid, saponin có mặt ở các cao chiết: Cồn 100% và cồn - nước 7: 3, không hoặc ở cường độ yếu (ở dạng vết) khó quan sát bằng định tính ở hai cao chiết còn lại. Courmarin không hoặc ở cường độ yếu (ở dạng vết) khó quan sát bằng định tính ở cao chiết cồn, xuất hiện ở 3 cao chiết còn lại. Sự có mặt của hầu hết các lớp chất ở các cao chiết bằng hỗn hợp cồn/nước cũng liên quan tới khả năng chiết xuất vụn năng của dung môi cồn so với nước.

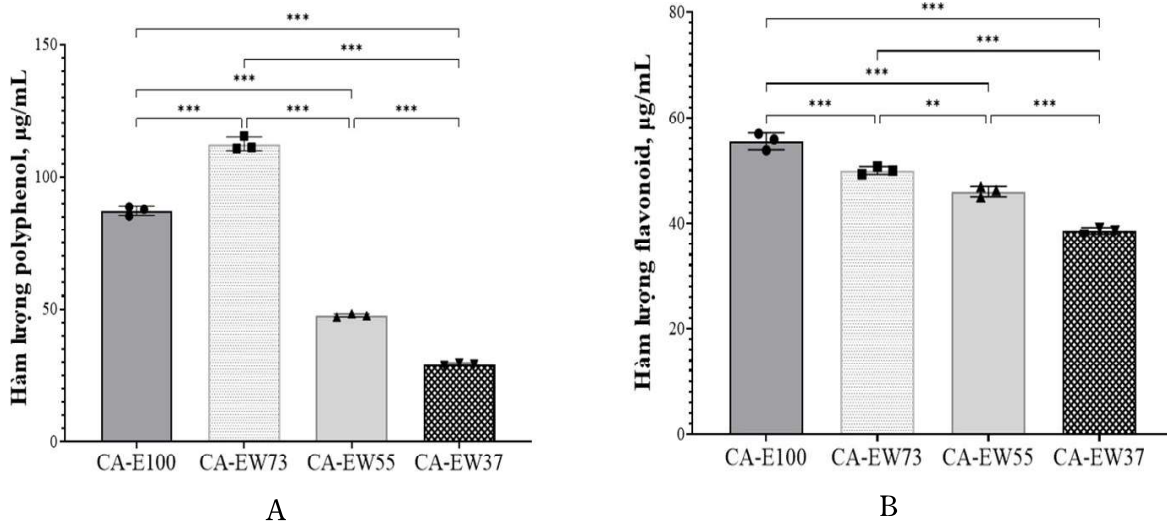
Polyphenol là nhóm hợp chất hữu cơ, có mặt nhiều trong thực vật. Việc nghiên cứu hàm lượng và hoạt tính dược lý của polyphenol đã trở thành một lĩnh vực mới, được quan tâm trong dinh dưỡng và thực phẩm trong những thập kỷ gần đây [23]. Các nghiên cứu trên động vật, trên người và dịch tễ học cho thấy, nhiều hợp chất thuộc nhóm polyphenol có đặc tính chống oxy hóa và chống viêm, có thể có tác dụng phòng ngừa và/hoặc điều

trị bệnh tim mạch, rối loạn thoái hóa thần kinh, ung thư và béo phì [24], [25].

Flavonoid là một trong những nhóm chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật chủ yếu có trong các bộ phận ăn được của thực vật như trái cây, rau, thân, ngũ cốc và vỏ cây. Chúng được tổng hợp theo con đường phenylpropanoid. Flavonoid có đặc tính kháng khuẩn, kháng vi rút, chống oxy hóa, chống viêm, chống đột biến và chống ung thư. Do có nhiều ứng dụng trị liệu khác nhau, nhiều công ty dược phẩm đã khai thác các loại thực vật khác nhau để sản xuất flavonoid [26].

3.3. Hàm lượng polyphenol và flavonoid của cao chiết từ cây rau má

Để xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid, đường chuẩn gallic axit và quercetin được xây dựng trong dải nồng độ: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$ ở bước sóng 765 và 415 nm. Kết quả thu được phương trình đường chuẩn gallic axit và quercetin tương ứng là: $y = 0,0102x - 0,037$ ($R^2 = 0,9978$) và $y = 0,0131x - 0,054$ ($R^2 = 0,9978$). Dựa trên phương trình đường chuẩn tính được hàm lượng polyphenol và flavonoid của các cao chiết. Kết quả ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của các cao chiết CA-E100, CA-EW73, CA-EW55 và CA-EW37 được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của các cao chiết rau má

A - Polyphenol; B - Flavonoid

Kí hiệu: **, *** thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê, Turkey's test, $P < 0,05$

Theo đó, đối với flavonoid, tổng hàm lượng flavonoid trong các cao chiết giảm dần theo thứ tự CA-E100 > CA-EW73 > CA-EW55 > CA-EW37 với giá trị tương ứng lần lượt là $55,51 \pm 1,59$; $49,44 \pm 0,73$; $46,03 \pm 0,99$; $38,58 \pm 0,64$ mg GAE/g. Hàm lượng polyphenol tổng số trong các cao chiết giảm dần theo thứ tự CA-EW73 > CA-E100 > CA-EW55 > CA-EW37 với giá trị tương ứng là $112,29 \pm 2,59$; $87,38 \pm 1,75$; $47,64 \pm 0,65$; $29,23 \pm 0,45$ mg QE/g.

Như vậy, để tạo cao chiết có hàm lượng flavonoid cao nhất có thể lựa chọn dung môi ethanol 100%, để tạo cao chiết có hàm lượng polyphenol tổng số cao nhất có thể lựa chọn dung môi ethanol/nước theo tỉ lệ 7/3. Hai cao chiết CA-E100 và CA-EW73 được coi như 2 cao chiết chứa các nhóm chất polyphenol và hàm lượng flavonoid cao, có tiềm năng trong các thử nghiệm về hoạt tính sinh học như: Hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính kháng viêm.

3.4. Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết rau má

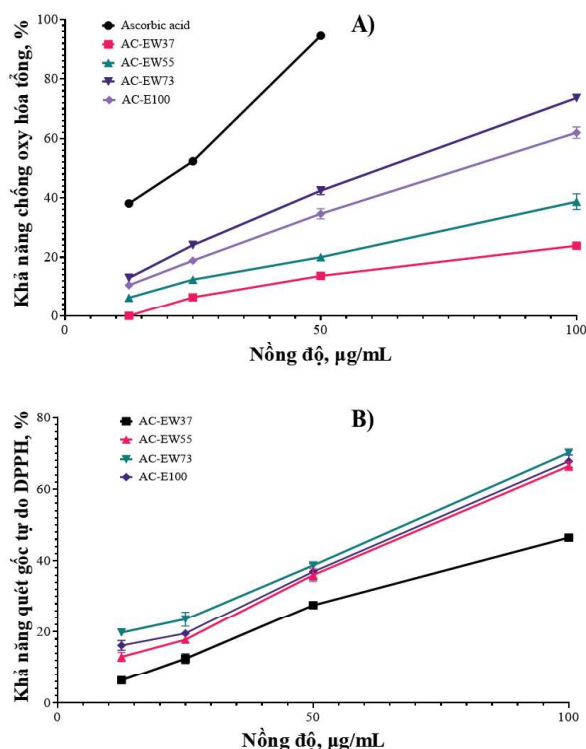
Hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp phosphomolybdenum.

Hoạt tính kháng oxy hóa của 4 cao chiết được thực hiện theo phương pháp phosphomolybdenum [18]. Thí nghiệm được tiến hành đối với các mẫu cao chiết ở các dải nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mẫu cao chiết đều thể hiện tính oxy hóa khá cao (Hình 2).

Kết quả thu được cho thấy, cao chiết cồn - nước (7: 3) (CA-EW73) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tổng tốt nhất, sau đó đến cao chiết cồn 100% (CA - E100), cao chiết cồn - nước (5: 5) (CA - EW55) và cao chiết cồn - nước (3: 7) (CA-EW37) với giá trị EC_{50} của các cao chiết kể trên có giá trị lần lượt là: 63,98; 78,51; 131,28 và 196,23, thấp hơn đối chứng dương là ascorbic axit.

Bảng 3. Giá trị EC_{50} đối với các hoạt tính đã thử nghiệm trên các cao chiết rau má

Các cao chiết	EC_{50}		
	Hoạt tính chống oxy hóa tổng	Khả năng quét gốc tự do DPPH	Khả năng ức chế sản sinh NO
AC-EW37	$105,14 \pm 2,79^{bcde}$	$196,23 \pm 4,23^{bcde}$	



Hình 2. Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết rau má

A - Hoạt tính chống oxy hóa tổng (TAA), %; B - Khả năng quét gốc tự do DPPH, %.

Hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp quét gốc tự do DPPH

Về nguyên tắc, các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt. Giá trị mật độ quang OD càng thấp chứng tỏ khả năng trung hòa gốc tự do DPPH càng cao. Quá trình thực nghiệm thu được phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc của OD vào nồng độ của cao chiết. Từ đó tính được khả năng ức chế 50% cao chiết và tính được giá trị EC_{50} (Bảng 3).

AC-EW55	79,95 ± 2,35 ^{acde}	131,28 ± 2,15 ^{acde}	147,07 ± 2,35 ^{cdf}
AC-EW73	67,03 ± 1,54 ^{abe}	63,98 ± 1,23 ^{abde}	58,72 ± 1,05 ^{bdf}
AC-E100	71,30 ± 1,79 ^{abe}	78,50 ± 1,87 ^{abce}	63,92 ± 2,23 ^{bcf}
Ascorbic axit	5,22 ± 0,22 ^{abcd}	21,53 ± 0,78 ^{abcd}	
Dexamethasone			16,07 ± 0,68 ^{bcd}

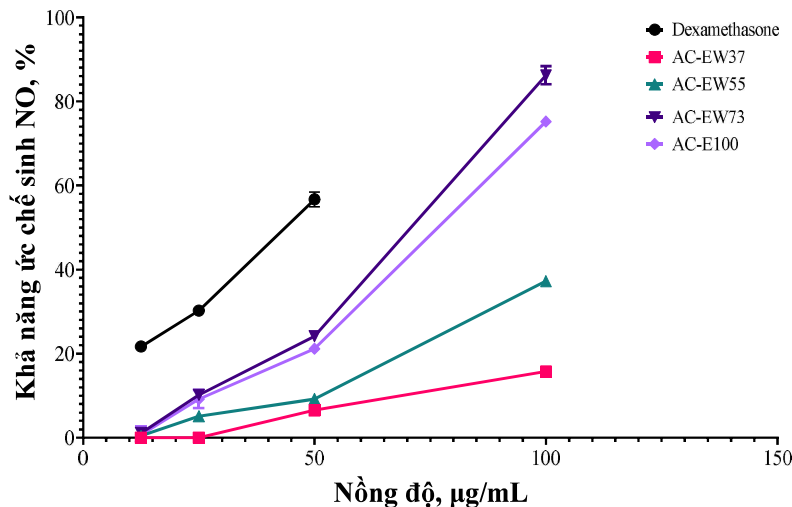
Ghi chú: ^{a, b, c, d, e, f} Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các mẫu AC-EW37, AC-EW55, AC-EW73, AC-E100, ascorbic axit, dexamethasone (Turkey's test, $P < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau khi cho cao chiết vào tác dụng với dung dịch phản ứng thì màu tím của DPPH dần biến mất và chuyển sang màu vàng. Ở tất cả các cao chiết đều thể hiện cường độ khá mạnh. Cả 4 cao chiết đều có hoạt tính quét gốc tự do DPPH mạnh, giảm dần theo thứ tự: AC-EW73 > AC-E100 > AC-EW55 > AC-EW37 với giá trị EC_{50} tương ứng là: 67,03; 71,29; 79,95; 105,14 $\mu\text{g/mL}$. Như vậy, có thể thấy mối liên quan tương đối giữa hàm lượng các nhóm chất: Polyphenol và flavonoid trong các cao chiết và hoạt tính quét gốc tự do DPPH của chúng. Theo kết quả phân tích ở trên, cao chiết AC-EW73 có hàm lượng polyphenol cao nhất, hàm lượng flavonoid chứa nhiều trong cao chiết CA - E100. Tuy giá trị EC_{50} còn cao hơn rất nhiều so với ascorbic axit, nhưng đối với các

cao chiết thô, giá trị $EC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ được coi là có hoạt tính.

3.5. Khả năng ức chế sản sinh NO của cao chiết rau má

NO là một phân tử tín hiệu có vai trò quan trọng đối với cơ chế bệnh sinh của phản ứng viêm và có liên quan với bệnh ung thư, NO được chuyển hoá và phóng thích vào các tế bào nội mô thông qua sự xúc tác của các enzyme nitric oxide synthetase khi chuyển đổi arginine thành citrulline và sản sinh ra NO thông qua quá trình viêm [27]. Do đó, có thể sơ bộ đánh giá khả năng kháng viêm của mẫu cần nghiên cứu bằng việc đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết từ cây rau má

Dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính mối quan hệ giữa nồng độ cao chiết và khả năng ức chế sản sinh NO xác định được nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO (giá trị EC_{50}). Theo đó, giá trị

EC₅₀ của các cao chiết AC-E100, AC-EW73, AC-EW55 lần lượt là: 63,92; 58,71; 147,07 µg/mL. Khả năng ức chế sản sinh NO của các cao chiết có thể được giải thích bởi sự có mặt của một số lớp chất riêng rẽ như phenylpropanoid [28], hay tác động hiệp đồng của các nhóm chất khác nhau chứa trong cao chiết. Theo một số quan điểm, khả năng chống oxy hóa là đặc tính phổ biến nhất liên quan đến việc ức chế sự giải phóng NO [29, 30].

Cao chiết AC-EW37 không thể hiện hoạt tính. Chất đối chứng dương dexamethasone hoạt động ổn định trong thí nghiệm, thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO ở các nồng độ 0,8; 4; 20 µg/mL lần lượt là: 21,68; 30,23; 56,69%. Giá trị EC₅₀ của dexamethasone là 16,07 µg/mL.

Như vậy, với tiềm năng kháng oxy hóa và ức chế sản sinh NO cho thấy, rau má hoàn toàn có thể được sử dụng để bào chế thành các dạng thực phẩm khác nhau nhằm phục vụ chăm sóc sức khỏe con người.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong bốn loại hệ dung môi sử dụng thì chiết bằng dung môi ethanol: Nước theo tỉ lệ 7: 3 hoặc dung môi ethanol 100% là phù hợp để sử dụng trích ly bột rau má trong định hướng phát triển các sản phẩm kháng oxy hóa và kháng viêm từ cây rau má. Kết quả nghiên cứu cũng khẳng định phần nào tác dụng của cây rau má được mô tả trong y học cổ truyền. Cồn thực phẩm và nước là hai loại dung môi an toàn, được phép sử dụng trong chế biến thực phẩm. Việc sử dụng hai loại dung môi này để tạo các cao chiết, sau đó sử dụng các loại cao chiết này để bào chế các sản phẩm như trà cốt hòa tan, viên nén và các chế phẩm tiện dụng khác có một số tác dụng như giải nhiệt, mát gan hoàn toàn hợp lý. Nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và cấu trúc các chất chứa trong cao chiết, cũng như bào chế các sản phẩm từ các cao chiết sẽ được thực hiện ở những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập II. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 582 - 586.

2. Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, Hà Nội, 631 - 632.

3. Bylka W., Znajdek-Awizeń P., Studzińska-Sroka E., Dańczak-Pazdrowska A., Brzezińska M. (2014). *Centella asiatica* in dermatology: An overview. *Phytotherapy Research*, 28(8): 1117 - 1124.

4. Chong N. J., Aziz Z. (2011). A systematic review on the chemical constituents of *Centella asiatica*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(3): 445 - 459.

5. Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2007). *Herbal medicines*, 3rd ed. London: Pharmaceutical Press.

6. Quin D. R. and Zhang W. D. (1998). Essential oil from *Centella asiatica* and its antidepressant activity. *Dier Jun Yi, Da Xue Bao*, 19(2): 186 - 187.

7. Oyedele O. A., Afolayan A. J. (2008). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Centella asiatica* growing in South Africa. *Pharmaceutical Biology*, 43(3): 249 - 253.

8. Azerad R. (2016). Chemical structures, production and enzymatic transformations of saponins and saponins from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Fitoterapia*, 114: 168 - 187.

9. Hashim P., Sidek H., Helan M. H. M., Sabery A., Palanisamy U. D., Ilham M. (2011). Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16(2): 1310 - 1322.

10. Razali N. N. M., Ng C. T., Fong L. Y. (2019). Cardiovascular protective effects of *Centella asiatica* and its triterpenes: a review. *Planta medica*, 85(16): 1203 - 1215.

11. Seevaratnam V., Banumathi P., Premalatha M. R., Sundaram S. P., Arumugam T. (2012). Functional properties of *Centella asiatica* (L.): A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4: 8 - 14.

12. Guo J. S., Cheng C. L., Koo M. (2004). Inhibitory effects of *Centella asiatica* water extract and asiaticoside on inducible nitric oxide synthase

during gastric ulcer healing in rats. *Planta Medica*, 70(12): 1150 - 1154.

13. Azis H. A., Taher M., Ahmed A. S., Azizi W. M. (2017). *In vitro* and *In vivo* wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. *South African Journal of Botany*, 108: 163 - 174.

14. AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 12th ed. Method 984.23, 920.39, 942.05*. Washington: Association of Official Analytical Chemists.

15. Cao T. H., Luc Q. T., Nguyen V. H., T. N. Q. Le, Nguyen T. L. H., Nguyen M. H., Trinh D. K. (2022). Assessment of the physicochemical properties and biological activity of Vietnamese single-bulb black garlic. *Food Science*, 49: 101866.

16. Yadav R. N. S., Agarwala M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants, *Journal of Phytology*, 3(12): 10 - 14.

17. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3): 178 - 182.

18. Umamaheswari M., Chatterjee T. K. (2017). *In vitro* antioxidant activities of the fractions of *Coccinnia grandis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 5(1): 61 - 73.

19. Choi S., Cha H. S., Lee Y. S. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, 19(10): 16811 - 16823.

20. Liao H., Banbury L., Liang H., Wang X., Lü X., Hu L., Wu J. (2014). Effect of Honghua (*Flos Carthami*) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α -glucosidase activity. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34 (3): 362 - 336.

21. Bộ Y Tế (2017). Dược điển Việt Nam. Nxb Y học.

22. Ho Van Ba, Hyun-Woo Seo, Soo-Hyun Cho, Yoon-Seok Kim, Jin-Hyoung Kim, Jun-Sang Ham,

Beom-Young Park, Seong Pil-Nam (2017). Effects of extraction methods of shiitake by-products on their antioxidant and antimicrobial activities in fermented sausages during storage. *Food Control*, 79: 109 - 118.

23. Lecour S, Lamont K. T. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11 (14): 1191 - 1199.

24. Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalber A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(3): 112 - 120.

25. Singh A., Holvoet S., Mercenier A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(10): 1346 - 1359.

26. Arpita R., Ariba K., Irfan A., et al. (2022). Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International*, 5445291.

27. Sharma J., Al-Omran A., Parvathy S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15: 252 - 259.

28. Abreu L. S., Nascimento Y. M. D., Espirito-Santo R. F. D., Meira C. S., Santos I. P., Brandão R. B., Souto A. L., Guedes M. L. S., Soares M. B. P., Villarreal C. F., et al. (2020). Phenylpropanoids from *Croton velutinus* with cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*, 145:104632.

29. Aquilano K., Baldelli S., Rotilio G., Ciriolo M.R. (2008). Role of nitric oxide synthases in parkinson's disease: A review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical Research*, 33: 2416 - 2426.

30. Jung Y., Bor H. Y. C., Gow C. Y. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 1680 - 1686.

INFLUENCE OF SOLVENT ON FLAVONOID, POLYPHENOL CONTENT, ANTIOXIDANT CAPACITY AND NITRIC OXIDE INHIBITION OF *Centella asiatica* EXTRACTS

Cao Thi Hue¹, Ha Thi Dung², Nguyen Thi Lan Huong^{1,*}

¹ *Thuyloi University*

² *Hanoi University of Industry*

Summary

This study investigated the influence of solvents on the total polyphenol and flavonoid content; antioxidant and anti-inflammatory activity (NO inhibition) of *Centella asiatica* extracts. Food-grade ethanol 90° (ethanol) and ethanol/water mixtures at ratios of 7: 3, 5: 5, and 3: 7 were used as the extracting solvents, yielding the corresponding extracts CA-E100, CA-EW73, CA-EW55 and CA-EW37, respectively. The results showed that the CA-EW73 extract had the highest total polyphenol content of 112.29 mg QE/g, while the CA-E100 extract had the highest total flavonoid content of 55.51 mg GAE/g. The CA-EW73 extract also exhibited the best antioxidant activity as determined by the phosphomolybdenum and DPPH methods and the best ability to inhibit nitric oxide production with EC₅₀ values of the assays were 67.03, 63.98 and 50.29 µg/mL, respectively. These results facilitate selecting suitable solvent in developing natural antioxidant and natural NO inhibitory products derived from *Centella asiatica*.

Keywords: *Centella asiatica*, extraction solvent, antioxidant, inhibit NO production.

Ngày nhận bài: 18/9/2024

Ngày chuyển phản biện: 9/10/2024

Ngày thông qua phản biện: 18/10/2024

Ngày duyệt đăng: 26/11/2024