

HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG VÀ TÁC DỤNG CHỐNG OXY HOÁ IN VITRO CỦA CÂY NHÀU NƯỚC (MORINDA PERSICAEFOLIA) MỘC TẠI AN GIANG

Lý Tiểu Hạnh¹, Nguyễn Thị Kim Thoai¹, Trần Thị Cẩm Thi¹, Lê Kim Khánh¹,
Nguyễn Ngọc Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Bé Tuổi¹, Lê Thanh Vĩnh Tuyền^{1,2*}

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Y khoa Đài Bắc, Đài Loan

*Email: ltvtyuyen@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Các nghiên cứu về tác dụng sinh học của Nhàu nước (*Morinda persicaefolia*) chưa được công bố rộng rãi như các loài khác trong chi Nhàu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định hàm lượng polyphenol tổng và sàng lọc in vitro hoạt tính chống oxy hóa trên các cao phân đoạn của dược liệu Nhàu nước. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Bột Nhàu nước (rễ, thân, lá) được chiết xuất với dung môi ethanol 70 % bằng phương pháp chiết lạnh, dịch chiết thu được sau đó được lắc chiết phân bố lỏng-lỏng với ba loại dung môi có độ phân cực tăng dần dichloromethan, ethyl acetat, nước. Hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu và hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH. **Kết quả:** Hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính chống oxy hóa tính bằng IC_{50} trên mô hình DPPH lần lượt trong khoảng 103,19 đến 148,58 mg GAE/g và 197,96 đến 1245,87 ppm. Trong đó, hàm lượng polyphenol tổng của cao dichloromethan từ rễ cao nhất (148,58 mg GAE/g). Hoạt tính chống oxy hóa của cao ethyl acetat từ thân cho kết quả tốt nhất ($IC_{50} = 197,96$ ppm). **Kết luận:** Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng tất cả các dịch chiết được thử nghiệm có hàm lượng phenolic đáng kể và thể hiện hoạt tính chống oxy hóa khá tốt. Đây có thể được dùng như gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo về việc phân lập, xác định cấu trúc và đặc tính của các hợp chất có hoạt tính sinh học tiềm năng của cây Nhàu nước (*Morinda persicaefolia*).

Từ khóa: Nhàu nước, chống oxy hóa, hàm lượng phenolic, DPPH, Folin-Ciocalteu.

ABSTRACT

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MORINDA PERSICAEFOLIA COLLECTED IN AN GIANG PROVINCE

Ly Tieu Hanh¹, Nguyen Thi Kim Thoai¹, Tran Thi Cam Thi¹, Le Kim Khanh¹,
Nguyen Ngoc Phuong Thao¹, Nguyen Thi Be Tuoi¹, Le Thanh Vinh Tuyen^{1,2*}

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Taipei Medical University, Taiwan

Background: Studies on biological activity of *Morinda persicaefolia* had not been published widely as other species of genus *Morinda*. **Objective:** To investigate total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity of different extracts of *Morinda persicaefolia* collected in An Giang Province, Viet Nam. **Materials and methods:** Root, stem and leaf powder were extracted with ethanol 70% using room-temperature extraction method and then liquid-liquid partitioned with graduated solvents: dichloromethane, ethyl acetate, distilled water. The TPC was determined by using the Folin-Ciocalteu assay and the antioxidant activity was evaluated by DPPH assay. **Result:** TPC and antioxidant activity expressing as IC_{50} values ranged from 103.19 to 148.58 mg GAE/g and 197.96 to 1245.87 ppm, respectively. Among them, the dichloromethane extract of the roots was the highest in TPC (148.58 mg GAE/g). Antioxidant activity of the ethyl acetate extract of the stems was shown to be the best with the IC_{50} values of 197.96 ppm. **Conclusion:** This study indicated that all tested extracts had high TPC and exhibited relatively good antioxidant activity. The result of the

study could be a suggestion for further research on isolation, identification, and structural characterization of potentially bioactive compounds from *Morinda persicaefolia*.

Keywords: *Morinda persicaefolia*, antioxidant, polyphenol, DPPH, Folin-Ciocalteu.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Stress oxy hóa là kết quả của sự mất cân bằng của các phản ứng chống oxy hóa. Các gốc tự do dư thừa có thể làm hỏng lipid, protein hoặc DNA của tế bào và ức chế chức năng bình thường của chúng. Các gốc tự do còn là “đồng minh” của sự lão hoá, do đó việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu, đặc biệt là các hợp chất chiết xuất từ thiên nhiên có khả năng chống oxy hóa có thể sử dụng để bảo vệ cơ thể khỏi stress oxy hóa giúp hạn chế bệnh tật và nâng cao sức khỏe của con người là điều hiện nay ngành Y Dược đang rất quan tâm.

Cây Nhàu nước (*Morinda persicaefolia*) là một loài thuộc chi Nhàu. Dân gian thường dùng rễ chữa đau lưng, nhức mỏi tay chân, tê thấp. Cây cũng được dùng trị cao huyết áp, dùng cho người bị mất ngủ, hồi hộp, loạn nhịp tim. Tuy nhiên, công dụng của cây Nhàu nước chủ yếu được truyền miệng trong dân gian, nghiên cứu và công bố về tác dụng của Nhàu nước còn chưa được rộng rãi như các loài khác trong chi Nhàu. Do đó, đề tài được thực hiện với mục tiêu: Xác định hàm lượng polyphenol tổng và sàng lọc *in vitro* hoạt tính chống oxy hóa trên các cao phân đoạn của dược liệu Nhàu nước nhằm góp phần gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo về Nhàu nước.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu dược liệu Nhàu nước nghiên cứu được thu hái ở huyện Phú Tân, tỉnh An Giang vào tháng 7/2018. Mẫu nghiên cứu có tên khoa học là *Morinda persicaefolia*, thuộc họ cà phê (Rubiaceae), được định danh và lưu tại phòng nghiên cứu Liên bộ môn Dược liệu-Dược cổ truyền-Thực vật dược, khoa Dược, trường Đại học Y Dược Cần Thơ. Sau khi thu hái, các bộ phận rễ, thân và lá được phân loại, cắt nhỏ, phơi sấy và làm khô ở nhiệt độ 50 °C và xay nhỏ đến dạng bột nửa thô, bảo quản nơi khô mát.

2.2. Dung môi hoá chất và thiết bị

2.2.1 Dung môi hoá chất

Cồn 96 %, nước cất, dichloromethan, ethylacetat, methanol, KOH khan của Việt Nam; dung dịch amoniac, bột vanilin, acid sulfuric, bột natri carbonat, vitamin C từ Trung Quốc; acid gallic, dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu từ Đức; DPPH từ Mỹ. Tất cả dung môi hoá chất dùng trong nghiên cứu đều đạt chuẩn tinh khiết dùng trong phân tích.

2.2.2 Dụng cụ thiết bị

Các máy móc, trang thiết bị tại phòng nghiên cứu của Liên Bộ môn Dược liệu-Dược cổ truyền-Thực vật dược, khoa Dược, trường Đại học Y Dược Cần Thơ: Tủ sấy Panasonic, tủ sấy chân không Salvis, máy cô quay áp suất giảm Heidolph (Đức), bếp cách thủy Memmert, cân kỹ thuật Kern 440-35A, cân phân tích Kern ABJ, đèn UV Camag hai bước sóng 254 nm và 365 nm, máy đo phổ UV-Vis Jasco-V730 (Nhật), cân xác định độ ẩm, bình sắc ký, máy rửa siêu âm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Chiết xuất

40 g bột dược liệu (rễ, thân, lá) được chiết xuất bằng phương pháp chiết lạnh với ethanol 70 % và cô quay dưới áp suất giảm thu được cao cồn toàn phần. Cao cồn toàn

phần được chiết phân bố lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần dicloromethan, ethyl acetat, nước và cô thu hồi dung môi thu được các cao phân đoạn: cao rễ dichloromethan (RDC) (0,51 g), cao rễ ethyl acetat (REA) (0,28 g), cao rễ nước (RW) (3,57 g), cao thân dichloromethan (SDC) (0,16 g), cao thân ethyl acetat (SEA) (0,09 g), cao thân nước (SW) (1,51 g), cao lá dichloromethan (LDC) (1,08 g), cao lá ethyl acetat (LEA) (0,2 g), cao lá nước (LW) (2,58 g).

2.3.2 Xác định hàm lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [4], [8] có sửa đổi để phù hợp với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm. Phương pháp này sử dụng acid gallic làm chất chuẩn và tổng hàm lượng polyphenol sẽ được tính bằng cách quy về lượng tương đương với acid gallic đối chiếu. Quy trình tiến hành như sau: cho dung dịch acid gallic 100 ppm với lượng khác nhau vào các đĩa 96 giếng, pha loãng đến 200 μ L bằng nước cất, thêm 30 μ L dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10 %, lắc đều, để yên, thêm tiếp 30 μ L dung dịch Na_2CO_3 và 40 μ L nước cất, đậy nắp, ủ trong 2 h ở nhiệt độ phòng rồi tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng (plate reader). Mẫu thử được tiến hành pha tương tự như dãy chuẩn acid gallic nhưng thay dung dịch acid gallic gốc bằng dung dịch mẫu có nồng độ 200 ppm. Thí nghiệm tiến hành với 3 lần lặp lại. Kết quả được biểu diễn bằng số mg acid gallic tương đương/g mẫu khô (mg GAE/g). Số liệu được trình bày bằng $\text{MEAN} \pm \text{SD}$.

Hàm lượng phenolic tổng được tính theo công thức: $P = \frac{A \times V}{m}$

Trong đó: P là hàm lượng phenolic tổng (mg GAE/g);

A là giá trị x từ đường chuẩn với gallic acid (mg/mL);

V là thể tích dung dịch cao chiết (mL);

m là khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.3.3 Thử nghiệm sàng lọc *in vitro* tác dụng chống oxy hóa trên mô hình DPPH

Sắc ký lớp mỏng

Chấm khoảng 20 μ L mẫu thử nồng độ 500 ppm lên bản mỏng. Bản mỏng sau khi khai triển với hệ dung môi thích hợp, để khô, soi dưới đèn UV ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm. Phát hiện vết lần lượt bằng thuốc thử DPPH 0,2 mM/ml trong MeOH và thuốc thử vanilin-acid sulfuric (1:1). Các dược liệu được đánh giá sơ bộ có tác dụng chống oxy hóa khi kết quả cho các vết màu vàng trên bản mỏng màu tím sau khi phát hiện bằng thuốc thử DPPH 0,2 mM/ml trong MeOH [3], [5].

Phương pháp đo quang phổ UV-Vis

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [3], [6], [12]. Quy trình được tiến hành như sau: 2 mL dung dịch mẫu thử pha trong MeOH ở các nồng độ khác nhau được cho vào 2 mL dung dịch DPPH 0,2 mM. Hỗn hợp được lắc đều và để yên trong tối 30 phút. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm. Mẫu thử sẽ được so sánh với mẫu chất đối chiếu là vitamin C được tiến hành tương tự như mẫu thử. Thí nghiệm tiến hành với 3 lần lặp lại. Khả năng chống oxy hóa được tính dựa vào phần trăm khả năng chống oxy hóa (HTCO %) và giá trị IC_{50} .

Hoạt tính chống oxy hóa được tính theo công thức: $\text{HTCO \%} = 100 \times (A_0 - A_t)/A_0$

Trong đó: HTCO % là phần trăm khả năng chống oxy hóa

A_0 là độ hấp thụ của mẫu chứng

A_t là độ hấp thụ của mẫu thử

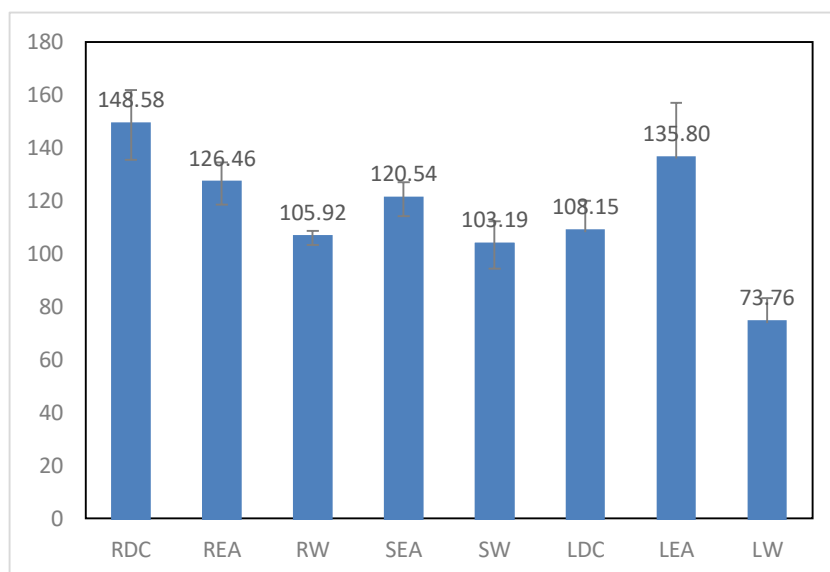
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hàm lượng polyphenol tổng

Tổng hàm lượng phenolic được đo bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu với chất chuẩn là acid gallic (phương trình đường chuẩn: $y = 0,2622x + 0,0192$ với $R^2 = 0,9979$) được thể hiện trong Bảng 1. Hàm lượng polyphenol tổng của các mẫu cao phân đoạn dao động từ 103,19 đến 148,58 mg GAE/g. Trong đó, cao chiết dichloromethan và ethyl acetat có hàm lượng cao hơn cao nước ở cả 3 bộ phận rễ, thân, lá.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol tổng của các cao phân đoạn Nhàu nước

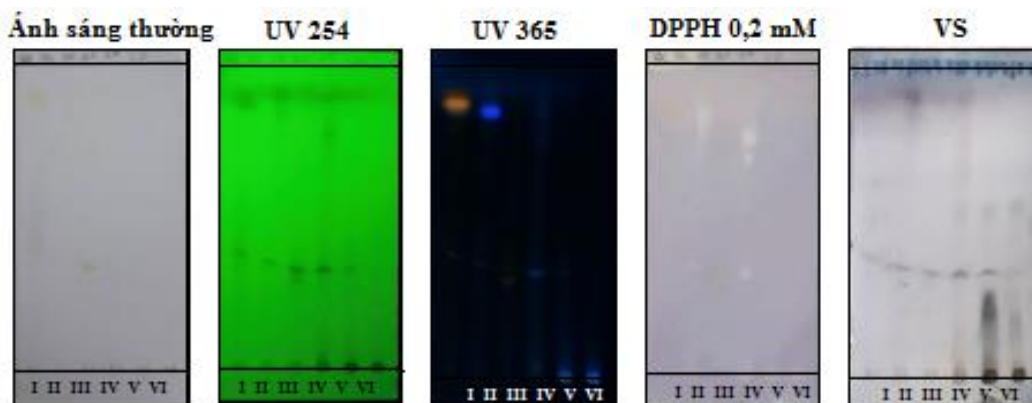
Mẫu	Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g)
Rễ	
RDC	$148,58 \pm 13,07$
REA	$126,46 \pm 7,99$
RW	$105,92 \pm 2,67$
Thân	
SEA	$120,54 \pm 6,31$
SW	$103,19 \pm 8,92$
Lá	
LDC	$108,15 \pm 11,82$
LEA	$135,80 \pm 21,02$
LW	$73,76 \pm 9,30$



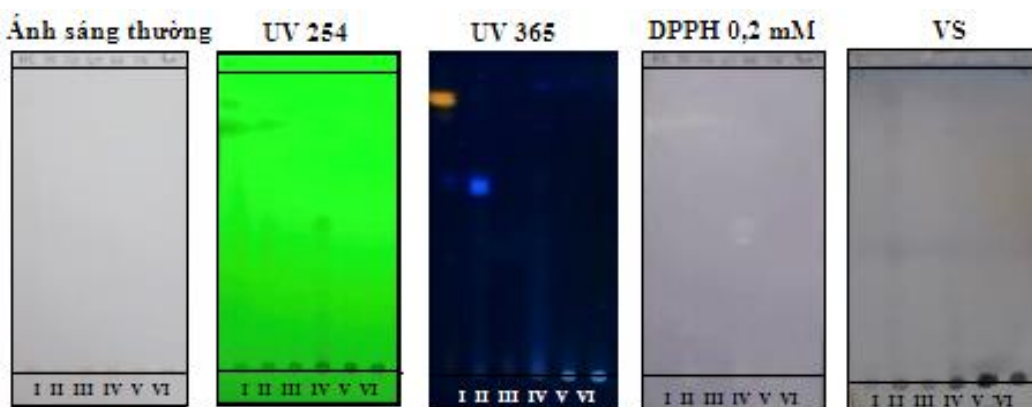
Hình 1: Biểu đồ hàm lượng polyphenol tổng ở các cao phân đoạn Nhàu nước (mg AE/g)

3.2. Thử nghiệm sàng lọc *in vitro* tác dụng chống oxy hóa trên mô hình DPPH

Sàng lọc trên SKLM



Hình 2: SKLM của 6 mẫu cao
Hệ dung môi: EA-MeOH-acid formic (8:2:1) (Hình 2)



Hình 3: SKLM của 6 mẫu cao
Hệ dung môi: benzen-aceton-acid formic (7:2:1) (Hình 3)

I: RDC II: SDC III: REA
IV: SEA V: RW VI: SW

Từ 2 hệ dung môi thăm dò (xem Hình 2 và Hình 3) thì hệ dung môi EA-MeOH-acid formic (8:2:1) cho kết quả tách tốt hơn, vết gọn và R_f thích hợp, do đó có thể chọn hệ dung môi này để phát hiện vết trên SKLM.

Kết quả cho thấy cao SEA có tác dụng chống oxy hoá mạnh nhất với 3 vết hiện màu vàng sáng trên nền tím của thuốc thử DPPH trên SKLM với hệ dung môi EA-MeOH-acid formic (8:2:1) và với 2 vết hiện màu vàng sáng trên nền tím của thuốc thử DPPH trên SKLM với hệ dung môi benzen-aceton-acid formic (7:2:1). Do đó, sơ bộ kết luận mẫu SEA có tiềm năng chống oxy hoá tốt nhất.

Phương pháp đo quang phổ UV-Vis

Bảng 2. Giá trị IC_{50} của các cao phân đoạn Nhàu nước

Mẫu	IC_{50} (ppm)
Rễ	
RDC	270,68
REA	556,81
RW	646,69
Mẫu	IC_{50} (ppm)

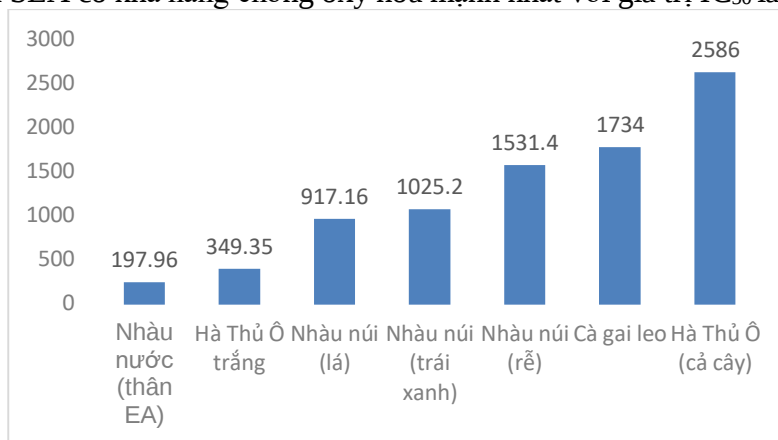
Thân	
SDC	279,76
SEA	197,96
SW	292,52
Lá	
LDC	1245,87
LEA	258,40
LW	498,01
Vitamin C	
	3,80

Hiệu quả loại bỏ 50 % gốc tự do được trình bày ở Bảng 2, giá trị IC_{50} của rễ, thân và lá Nhàu nước dao động từ 197,96 đến 1245,87 ppm. Trong đó mẫu thân SEA có giá trị IC_{50} thấp nhất là 197,9 ppm nên cho tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất. Thứ tự hoạt tính chống oxy hóa các cao phân đoạn được sắp xếp theo thứ tự giảm dần: SEA > LEA > RDC > SDC > SW > LW > REA > RW > LDC.

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp Folin-Ciocalteu xác định hàm lượng polyphenol tổng được coi là hữu ích để sàng lọc nhanh chóng nhiều mẫu và đối với nhiều ứng dụng cần một phép đo đơn giản về tổng lượng polyphenol là đủ. Đồng thời để đảm bảo tính đồng nhất, giảm thời gian cũng như giảm chi phí, các mẫu cao được thực hiện đo với đĩa 96 giếng.

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định từ cao chiết dichloromethan (DC) và ethyl acetat (EA) cao hơn so với cao chiết nước (W), cho thấy hàm lượng phenolic tổng trong các cao chiết phụ thuộc vào loại dung môi lắc chiết, cụ thể là độ phân cực của dung môi được sử dụng để lắc chiết [10]. Với kết quả hàm lượng polyphenol tổng cho thấy rễ, thân, lá cây Nhàu nước có hàm lượng polyphenol cao, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về thành phần hóa học của cây Nhàu nước [1], [2]. Ngoài ra, nghiên cứu Paixao (2007) cho thấy, tổng hàm lượng polyphenol có liên quan đến các hoạt tính sinh học, nhất là hoạt tính kháng oxy hóa [9]. Chính vì vậy, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn về mối tương quan giữa hoạt tính sinh học với các hợp chất polyphenol trong cây Nhàu nước nhằm tìm ra nhiều hoạt chất có ứng dụng cao trong y học. Các cao chiết phân đoạn của mẫu rễ, thân, lá của dược liệu Nhàu nước đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa trên mô hình DPPH *in vitro*, trong đó mẫu SEA có khả năng chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 197,96 ppm.



Hình 4: Biểu đồ IC_{50} của các cao dược liệu (ppm)

Khi so sánh giá trị IC_{50} của mẫu SEA so với các loại dược liệu khác như Hà thủ ô

trắng (*Streptocaulon juvenas*) [6], lá, trái xanh, rễ Nhàu núi (*Morinda citrifolia*) [7], Cà gai leo (*Solanum hainanense*) và Hà thủ ô (cả cây) (*Streptocaulon juvenas*) [11] (Hình 4) thì khả năng chống oxy hóa của cao SEA từ Nhàu nước là khá cao so với các mẫu khác. Từ kết quả này, phân đoạn cao ethyl acetat của thân Nhàu nước nên được nghiên cứu sâu hơn và xác định các thành phần có hoạt tính chống oxy hóa trên phân đoạn tiềm năng này.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu và hoạt tính chống oxy hóa trên mô hình DPPH của các cao phân đoạn trên dược liệu Nhàu nước. Trong các cao phân đoạn, hàm lượng polyphenol tổng dao động từ 103,19 đến 148,58 mg GAE/g. Hoạt tính chống oxy hóa của cao ethyl acetat từ thân Nhàu nước (SEA) mạnh nhất với giá trị $IC_{50} = 197,96$ ppm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh (2010), *Nghiên cứu thành phần hóa học của rễ nhàu nước*, Luận văn tốt nghiệp dược sĩ đại học, Trường Đại học Y dược Cần Thơ.
2. Nguyễn Thị Thu Nguyệt (2019), *Nghiên cứu thành phần hóa học của thân nhàu nước*, Luận văn tốt nghiệp dược sĩ đại học, Trường Đại học Y dược Cần Thơ.
3. Trần Bá Việt Quý (2015), *Sàng lọc in vitro thành phần hóa học có tác dụng chống oxy hóa của một số loài thuộc họ hoa mõm chó (Scrophulariaceae)*, Luận văn tốt nghiệp cao học, Trường Đại học Y dược TPHCM.
4. TCVN 9745-1:2013 (ISO 14502-1:2005)(2013), *Chè - Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen - Phần 1 - Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè – Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu*: Bộ Khoa học và Công nghệ.
5. Đặng Kim Thoa (2017), *Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của rễ cây Đinh Lăng (Polyscias fruticosa (L.) Harms) trồng tại An Giang*, Luận văn tốt nghiệp đại học, Trường Đại học Tây Đô.
6. Đái Thị Xuân Trang, Lâm Hồng Bảo Ngọc, Võ Thị Tú Anh (2015), *Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của cao methanol cây Hà thủ ô trắng (Streptocaulon juvenas MERR.)*, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 40, tr 1-6.
7. Đái Thị Xuân Trang, Nguyễn Thị Mai Phương, Võ Thị Ngọc Diễm, Quách Tú Huê (2012), *Khảo sát hiệu quả hạ đường huyết và chống oxy hóa của cao chiết cây Nhàu (Morinda citrifolia L.) ở chuột bệnh tiêu đường*, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 23b, tr 115-124.
8. Alexander Me dina-Remón (2009), "Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake", *Analytica Chimica Acta*, 634, pp 54-60.
9. Neuza Paixao, Rosa Perestrelo, José C. Marques, José S. Câmara (2009), Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines, *Food Chemistry*, 105(1), pp 204-214.
10. Praveen K. Ramamoorthy, Awang Bono (2007), "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes", *Journal of engineering science and technology*, 2(1), pp 70-80.
11. Quang-Vinh Nguyen, Jong-Ban Eun (2011), "Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), pp 2798-2811.
12. T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos (2004), "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil", *Food Chemistry*, 85(4), pp 633-640.

(Ngày nhận bài: 05/08/2020 - Ngày duyệt đăng: 19/09/2020)