

**ẢNH HƯỞNG CỦA HAI PHƯƠNG PHÁP LÀM KHÔ ĐẾN
HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, FLAVONOID TOÀN PHẦN VÀ
TÁC DỤNG KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÁC CAO CHIẾT
TỪ LÁ CHÙM RUỘT (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.)**

Huỳnh Anh Duy*, Nguyễn Ngọc Giàu

Trường Đại học Cần Thơ

*Email: haduy@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Làm khô là một quá trình loại bỏ nước ra khỏi dược liệu, tránh gây ra các phản ứng thủy phân hoạt chất hoặc sự phát triển của vi sinh vật. Do đó, quá trình làm khô có thể ảnh hưởng đến hàm lượng của các hoạt chất trong dược liệu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Nghiên cứu nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của hai phương pháp làm khô dược liệu (sấy ở 60°C và phơi nắng, cùng thời gian làm khô) đến hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần và tác dụng kháng viêm *in vitro* của lá chùm ruột (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp quang phổ UV-Vis, dựa trên sự hình thành các phức màu. Đánh giá tác dụng kháng viêm *in vitro* theo phương pháp ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò do nhiệt của cao ethanol tổng và các cao phân đoạn: n-hexan, dichloromethan, ethyl acetat, nước. So sánh kết quả giữa hai phương pháp làm khô dược liệu. **Kết quả:** Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol (TPC), flavonoid toàn phần (TFC) ở dược liệu khi sấy ở 60°C thì cao hơn khi phơi nắng (TPC lần lượt là 12,94 mg GAE/gdw và 8,06 mg GAE/gdw; TFC lần lượt là 8,46 mg QE/gdw và 6,31 mg QE/gdw). Ngoài ra, dược liệu khi sấy 60 °C cho tác dụng kháng viêm *in vitro* cao hơn dược liệu phơi nắng, hiệu quả kháng viêm *in vitro* giảm dần tương ứng của các cao theo thứ tự như sau: cao ethyl acetat, cao ethanol tổng, cao dichloromethan, cao nước và cao n-hexan. Trong đó, cao ethyl acetat và ethanol tổng cho tác dụng kháng viêm cao nhất và tiềm năng (IC_{50} lần lượt 16,32 và 17,68 $\mu\text{g/ml}$ trên dược liệu sấy ở 60°C; trên dược liệu phơi nắng lần lượt là 19,12 và 21,98 $\mu\text{g/ml}$), khi so sánh với thuốc đối chiếu diclofenac có IC_{50} là 0,27 $\mu\text{g/ml}$. **Kết luận:** Phương pháp làm khô ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần và tác dụng kháng viêm *in vitro* của lá Chùm ruột.

Từ khóa: Chùm ruột, kháng viêm *in vitro*, flavonoid toàn phần, polyphenol toàn phần.

ABSTRACT

**EFFECT OF TWO DIFFERENT DRYING METHODS ON TOTAL
PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND *IN VITRO* ANTI-
INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE VARIOUS LEAF EXTRACTS
FROM *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.**

Duy Anh Huynh*, Giau Ngoc Nguyen

Can Tho University

Background: Drying is a process by which water is removed from the herb to prevent from causing the hydrolysis reaction of substrates or microbial growth. **Objectives:** Therefore, it may affect content of substrates in medicinal materials. On that basis, this study aims to evaluate the impact of two different drying treatments (sun drying and 60°C hot air oven drying, at the same time) in respect to total phenolic and flavonoid content and *in vitro* anti-inflammatory activity of the various extracts from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. leaves. **Materials and Methods:** Total phenolic and flavonoid contents were determined by spectrophotometric method using complex compounds. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phyllanthus acidus* was evaluated by bovine serum albumin denaturation method using total ethanol, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and water extracts. **Results:** Total phenolic

(TPC) and total flavonoid content (TFC) in herbs which were dried in hot air oven at 60°C were higher than of sun dried ones (TPC were 12.94 mg GAE/gdw and 8.06 mg GAE/gdw, respectively; TFC were 8.46 mg QE/gdw and 6.31 mg QE/gdw, respectively). In addition, *in vitro* anti-inflammatory activity in materials in hot air oven drying were also higher than in sun drying method, in descending order: ethyl acetate extract, total ethanol extract, dichloromethane extract, water extract and *n*-hexane extract. From the above results, it is showed that ethyl acetate and total ethanol extracts represented the most potential anti-inflammatory activity (IC_{50} values were 16.32 and 17.68 μ g/ml, in oven drying at 60°C and 19.12 and 21.98 μ g/ml, in sun drying, respectively,) in comparison with IC_{50} value of positive control was 0.27 μ g/ml. **Conclusion:** Drying methods affected total phenolic and flavonoid content and *in vitro* anti-inflammatory activity of the various extracts from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaves.

Keywords: *Phyllanthus acidus*, anti-inflammatory activity, total phenolic content, total flavonoid content.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là một quá trình phức tạp với các triệu chứng chính: sưng, nóng, đỏ, đau và kèm theo các triệu chứng phụ khác. Albumin là protein chiếm tỉ lệ rất lớn trong huyết thanh, albumin của con người và bò đều chứa 16% lượng nitơ. Vì thế, khi khảo sát khả năng ức chế biến tính albumin huyết thanh bò do nhiệt có thể gián tiếp dự đoán tác dụng kháng viêm của chất khảo sát. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, các hợp chất polyphenol (chủ yếu là flavonoid) trong dịch chiết dược liệu có tính kháng viêm bằng nhiều cách [1]. Chùm ruột (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) là loại thực vật phổ biến ở vùng nhiệt đới và Việt Nam, hầu hết các bộ phận được đều dùng làm thuốc. Riêng lá chùm ruột theo Đông Y dùng để chữa đau nhức, chữa lở ngứa, ghẻ loét, mề đay.

Ở Việt Nam, phơi và sấy là hai phương pháp phổ biến để làm khô dược liệu. Trong đó phơi nắng là phương pháp dễ thực hiện, ít tốn kém, được sử dụng rộng rãi ở các nơi khám, cấp thuốc y học cổ truyền. Sấy ở 60°C là phương pháp làm khô dược liệu phổ biến trong nghiên cứu khoa học. Việc định lượng polyphenol, flavonoid toàn phần và thử nghiệm tác dụng kháng viêm *in vitro* ở hai mẫu dược liệu giúp đưa ra những nhận định về ảnh hưởng của phương pháp làm khô đến hoạt tính kháng viêm và thành phần hóa học của dược liệu này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu lá chùm ruột (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.) được thu hái tại khu vực huyện Trà Ôn, tỉnh Vĩnh Long vào 6/2018. Mẫu được định danh bởi TS. Đặng Minh Quân, Bộ môn Sinh học, Khoa Sư Phạm, trường Đại học Cần Thơ.

Mẫu lá được làm khô bằng hai phương pháp khác nhau: sấy trong tủ sấy ở 60°C và phơi nắng trong cùng thời gian như nhau đến khô, sau đó lá khô được nghiền thành bột.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần

Điều chế cao methanol

Cân chính xác khoảng 5 g bột lá khô mỗi loại chiết nóng với 100 mL methanol 80 % trong 60 phút, bã được tiếp tục chiết với 20 mL methanol 80 % bằng phương pháp siêu âm 2 lần mỗi lần 10 phút. Các dịch chiết được gom lại trữ ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Gạn lấy lớp trên, lọc qua giấy lọc Whatman đến

khô, cân và bảo quản ở 4°C.

Định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần theo phương pháp của Sulaiman Mohammed và Fazilah Abd Manan (2015) [2], quy trình như sau:

Định lượng polyphenol toàn phần (TPC):

Các polyphenol trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp đo màu, dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu. Lấy 100 µL cao chiết, 900 µL nước và 100 µL thuốc thử Folin – Ciocalteu, ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thêm 300 µL dung dịch Na₂CO₃ (20%), ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng (điều kiện không có ánh sáng). Đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm. Nồng độ cuối cùng của cao chiết là 20 µg/mL. Xây dựng phương trình hồi quy chuẩn gallic acid (nồng độ 0-20 µg/mL). TPC được tính theo số mg gallic acid (GAE) trên 1 g dược liệu khô (mg GAE/gdw).

Định lượng flavonoid toàn phần (TFC):

Dựa trên khả năng hình thành phức màu giữa flavonoid với Al³⁺ trong môi trường kiềm. Lấy 200 µL cao chiết, thêm 150 µL dung dịch NaNO₂ (5%), ủ 6 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 150 µL dung dịch AlCl₃ 10%, ủ 6 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 800 µL dung dịch NaOH 10%, ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng. Đo mật độ quang ở bước sóng 510 nm. Nồng độ cuối cùng của cao chiết là 200 µg/mL. Xây dựng phương trình hồi quy với chất chuẩn quercetin (nồng độ 10-100 µg/mL). TFC được tính theo số mg quercetin (QE) trên 1 g dược liệu khô (mg QE/gdw).

Công thức:

$$TPC = \frac{GAE \left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times V (mL)}{m (mg)} \times K \times H$$

$$TFC = \frac{QE \left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times V (mL)}{m (mg)} \times K \times H$$

Trong đó:

TPC: polyphenol toàn phần (mg GAE/gdw); TFC: flavonoid toàn phần (mg QE/gdw).

GAE: nồng độ gallic acid từ phương trình hồi quy (µg/mL).

QE: nồng độ quercetin từ phương trình hồi quy (µg/mL).

V: thể tích mẫu (mL); m: khối lượng mẫu (mg). K: hệ số pha loãng. H: hiệu suất chiết cao sau khi đã trừ ẩm dược liệu (%).

2.2.2. Tác dụng kháng viêm *in vitro*

Điều chế các loại cao chiết

Cao ethanol tổng: 1 kg bột lá khô mỗi loại ngâm dầm trong dung môi ethanol 96%. Các cao phân đoạn: Chiết lỏng-lỏng cao ethanol tổng với các dung môi có độ phân cực tăng dần thu được lần lượt các cao khác nhau như sau: n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate và cao nước.

Thử nghiệm ức chế biến tính albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin denaturation method)

Thử nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Elias G và Rao MNA [4], có hiệu chỉnh cho phù hợp. Diclofenac được dùng là chất đối chiếu.

Tiến hành trên các mẫu sau đây:

Mẫu thử: 1 mL BSA 0,5% + 1 mL dung dịch cao chiết (1,6525-200 µg/mL) hoặc 1 mL dung dịch chất đối chiếu (1,6525-200 µg/mL).

Mẫu đối chứng: 1 mL BSA 0,5% + 1 mL dung dịch đệm phosphate 0,2 M pH 7,4.

Các mẫu được ủ ở $27^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút, sau đó tiếp tục ủ ở $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút. Sau đó, làm lạnh đến nhiệt độ phòng, đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Phần trăm ức chế biến tính được tính theo công thức sau: $\% \text{ ức chế} = 100(1 - \frac{OD_t}{OD_c})$

Với OD_t : mật độ quang của dung dịch thử; OD_c : mật độ quang của dung dịch đối chứng.

Xây dựng đường biểu diễn phần trăm ức chế theo nồng độ, tùy theo khả năng ức chế của mẫu thử nghiệm ở nồng độ khảo sát, tính IC_{50} , IC_{20} ($\mu\text{g/ml}$). Giá trị IC_{20} và IC_{10} được dùng trong trường hợp mẫu cao chiết không xác định được IC_{50} .

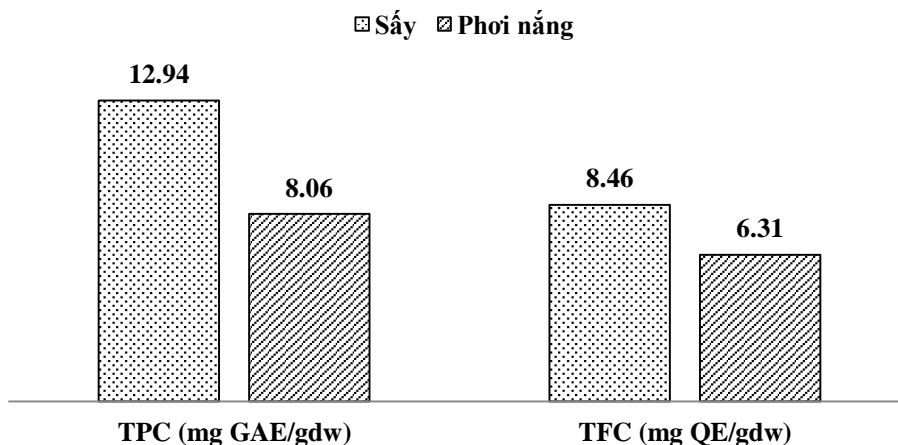
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Hàm lượng polyphenol toàn phần (TPC) và flavonoid toàn phần (TFC)

Ta thiết lập được phương trình hồi quy của chất chuẩn acid gallic ($y = 0,1012x + 0,1003$, $R^2 = 0,9925$) và chất chuẩn quercetin ($y = 0,0112x + 0,0099$, $R^2 = 0,9924$).

Từ kết quả này, tính toán được hàm lượng polyphenol toàn phần lần lượt là 12,94 mg GAE/gdw ở phương pháp sấy và 8,06 mg GAE/gdw ở phương pháp phơi nắng; hàm lượng flavonoid toàn phần lần lượt là 8,46 mg QE/gdw ở phương pháp sấy và 6,31 mg QE/gdw ở phương pháp phơi nắng, được thể hiện như Hình 1.

Hàm lượng TPC và TFC lá Chùm ruột với hai phương pháp làm khô



Hình 1. Hàm lượng TPC (mg GAE/gdw) và TFC (mg QE/gdw) lá Chùm ruột

3.2. Tác dụng kháng viêm *in vitro*:

Bảng 1 dưới đây thể hiện Phần trăm ức chế biến tính albumin (%) của các mẫu cao chiết và chất đối chiếu ở từng nồng độ khác nhau.

Bảng 1. Phần trăm ức chế biến tính albumin (%) của các mẫu cao chiết và chất đối chiếu

Mẫu		PHẦN TRĂM ỨC CHẾ (%)							
		Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)*							
		0,78125	1,5625	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Cao ethanol tổng	1	12,21	16,54	22,87	28,90	41,11	63,37	23,34	-12,64
	2	9,89	13,29	18,39	24,88	33,38	54,56	31,99	-7,11
Cao hex	1	2,01	2,16	2,78	3,25	4,17	6,65	9,74	3,09
	2	1,08	0,77	1,24	1,85	2,32	3,86	7,26	3,71

Cao DC	1	8,81	11,44	15,15	22,10	29,06	47,91	24,88	-5,56
	2	10,20	12,06	14,53	19,78	26,43	40,49	17,62	-11,90
Cao EA	1	14,53	17,77	24,11	29,98	43,28	67,23	25,66	-15,92
	2	12,83	15,30	20,25	27,20	38,64	60,12	38,79	-9,89
Cao nước còn lại	1	1,85	2,01	2,32	4,02	6,34	9,43	16,69	8,04
	2	1,55	1,70	2,16	4,48	7,42	11,75	19,78	5,56
Diclofenac		47,14	56,72	69,24	45,75	17,93	-7,26	-24,42	-56,11

Trong đó:

1: lá chùm ruột sấy ở 60 °C, 2: lá chùm ruột phơi nắng, *: nồng độ cuối cùng cao chiết, chất đối chiếu.

Cao hex: Cao n-hexane; Cao DC: Cao dichloromethan; Cao EA: Cao ethyl acetat.

Bên cạnh đó, từ việc thiết lập đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ ($\mu\text{g/ml}$) và phần trăm ức chế biến tính albumin huyết thanh bò (%), xác định được phương trình hồi quy và các giá trị IC_{50} , IC_{20} , IC_{10} .

Bảng 2. Giá trị IC_{50} , IC_{20} , IC_{10} của các mẫu cao chiết và chất đối chiếu

Mẫu		Phương trình tuyến tính	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{20} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{10} ($\mu\text{g/ml}$)
Cao ethanol tổng	1	$y = 2,0215x + 14,252 \quad R^2 = 0,9872$	17,68	2,84	
	2	$y = 1,7611x + 11,287 \quad R^2 = 0,9844$	21,98	4,95	
Cao hex	1	$y = 0,1573x + 2,1638 \quad R^2 = 0,9866$			49,82
	2	$y = 0,1275x + 0,8208 \quad R^2 = 0,9943$			71,99
Cao DC	1	$y = 1,5563x + 9,645 \quad R^2 = 0,9878$		6,65	0,23
	2	$y = 1,224x + 10,542 \quad R^2 = 0,9945$		7,72	-
Cao EA	1	$y = 2,1156x + 15,464 \quad R^2 = 0,9914$	16,32	2,14	
	2	$y = 1,9171x + 13,331 \quad R^2 = 0,9921$	19,12	3,48	
Cao nước	1	$y = 0,302x + 1,8139 \quad R^2 = 0,9942$			27,11
	2	$y = 0,3747x + 1,6664 \quad R^2 = 0,9884$			22,24
Diclofenac		$y = 10,923x + 47,063 \quad R^2 = 0,9999$	0,27		

Trong đó: 1: lá chùm ruột sấy ở 60°C, 2: lá chùm ruột phơi nắng.

Cao hex: Cao n-hexane; Cao DC: Cao dichloromethan; Cao EA: Cao ethyl acetat.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Hàm lượng polyphenol toàn phần (TPC) và flavonoid toàn phần (TFC)

Từ kết quả thể hiện ở hình 1, nhận thấy rằng hàm lượng TPC khi lá chùm ruột phơi nắng giảm khoảng 1,61 lần so với dùng phương pháp sấy. Một cách tương tự, hàm lượng TFC cũng giảm khoảng 1,34 lần khi dùng phương pháp phơi nắng. Điều này chứng tỏ việc phơi nắng có những ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần.

Tác dụng của việc làm khô dược liệu là làm bất hoạt enzym gây ra sự oxy hóa các polyphenol. Tuy nhiên, có kết quả khác nhau về TPC và TFC giữa cách làm khô khác nhau. Sự suy giảm thành phần TPC và TFC khi phơi nắng được giải thích là do các tia nắng mặt trời gây ra quá trình hoạt hóa enzyme (enzymatic processes) sẵn có trong dược liệu làm biến đổi các thành phần hóa học (phytochemical), trong suốt quá trình phơi nắng. Do phơi nắng không bất hoạt enzym ngay lập tức nên gây ra quá trình oxy hóa polyphenol (polyphenol oxidases). Từ đó làm giảm hàm lượng các hợp chất polyphenol nói chung.

4.2. Tác dụng kháng viêm *in vitro*

Qua kết quả Bảng 1 cho thấy rằng ở từng nồng độ tương ứng, dược liệu nếu sấy ở

60°C cho kết quả kháng viêm tốt hơn so với dược liệu được phơi nắng, thông qua những giá trị phần trăm ức chế biến tính albumin. Điều này cũng thể hiện ở tất cả các loại cao chiết. Bên cạnh đó, ta cũng có thể nhận định rằng chất đối chiếu và các mẫu cao chiết lá chùm ruột có khả năng ức chế biến tính albumin huyết thanh bò ở những khoảng nồng độ nhất định.

Tiếp theo, từ kết quả tính IC_{50} , IC_{20} , IC_{10} ở Bảng 2 có thể sắp xếp khả năng ức chế biến tính albumin giảm dần theo thứ tự sau đây: cao ethyl acetat, cao ethanol tổng, cao dichloromethan, cao nước và cao n-hexan. Thứ tự này giống nhau ở cả hai phương pháp làm khô. Kết quả thấy rằng mẫu có tác dụng kháng viêm cao nhất là mẫu ethyl acetat với giá trị IC_{50} thấp nhất, tiếp theo là cao ethanol tổng. Kết quả IC_{50} của hai mẫu cao này khi dược liệu lá được sấy ở 60°C lần lượt là 16,32 và 17,68 $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn so với dược liệu được phơi nắng là 19,12 và 21,98 $\mu\text{g/mL}$. Điều này xác nhận lại một lần nữa rằng lá Chùm ruột sấy ở 60°C cho kết quả kháng viêm *in vitro* tốt hơn so với phơi nắng. Từ các dữ liệu, có thể nhận định rằng cao ethyl acetat và cao ethanol tổng có khả năng ức chế biến tính albumin cao nhất là do ở hai cao này có chứa các nhiều các hợp chất polyphenol và flavonoid. Đây là những nhóm hợp chất được chứng minh là có hoạt tính kháng viêm. Ngoài ra, khi kết hợp với kết quả định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần ở trên, có thể thấy sự đồng nhất là khi phơi nắng làm giảm hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần, dẫn đến tác dụng kháng viêm *in vitro* cũng giảm theo.

V. KẾT LUẬN

Lá Chùm ruột có hàm lượng polyphenol toàn phần lần lượt là 12,94 mg GAE/gdw ở phương pháp sấy và 8,06 mg GAE/gdw ở phương pháp phơi nắng; hàm lượng flavonoid toàn phần lần lượt là 8,46 mg QE/gdw ở phương pháp sấy và 6,31 mg QE/gdw ở phương pháp phơi nắng. Hàm lượng TPC và TFC khi sấy 60°C cao hơn khi phơi nắng dược liệu. Khả năng ức chế biến tính albumin huyết thanh bò giảm dần từ cao ethyl acetat, cao ethanol tổng, cao dichloromethan, cao nước và cao n-hexan. Trong đó, cao ethyl acetat và ethanol tổng cho tác dụng kháng viêm cao nhất và tiềm năng (IC_{50} lần lượt là 16,32 và 17,68 $\mu\text{g/ml}$ trên dược liệu sấy ở 60 °C; 19,12 và 21,98 $\mu\text{g/ml}$ trên dược liệu phơi nắng), khi so sánh với thuốc đối chiếu diclofenac có IC_{50} là 0,27 $\mu\text{g/ml}$. Nhìn chung, khả năng kháng viêm *in vitro* của các cao chiết từ lá Chùm ruột sấy ở 60°C tốt hơn so với dược liệu khi phơi nắng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Midori Natsume, 2018. Polyphenols: Inflammation. *Curr Pharm Des.* 24(2). 192-202.
2. Sulaiman Mohammed, Fazilah Abd Manan, 2015. Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from *Moringa oleifera* seed extract. *J Chem Pharm Res.* 7(1), 132-135.
3. Elias G, Rao MNA, 1988. Inhibition of albumin Denaturation and anti-inflammatory activity of dehydrozingerone and its analogs. *Indian J Exp Biol.* 26, 540-42.
4. Santanu Sannigrahi *et al*, 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of *Pterospermum acerifolium*. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2(1), 1-5.
5. Lim YY, Murtijaya J, 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT-Food Sci Technol.* 40(9), 1664- 1669.

(Ngày nhận bài: 09/07/2019- Ngày duyệt đăng: 22/08/2019)
