

# KHẢO SÁT ĐỊNH TÍNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT DIỆP HẠ CHÂU (PHYLLANTHUS AMARUS SCHUM.ET THONN)

● NGUYỄN XUÂN THỊ DIỄM TRINH - LÝ TRƯỜNG DŨ - PHẠM HUỲNH NGÂN

## TÓM TẮT:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm định tính thành phần hóa học cũng như khả năng kháng oxy hóa của cao chiết diệp hạ châu, với nguồn nguyên liệu được thu hái ở xã Huyền Hội, huyện Càng Long, tỉnh Trà Vinh. Kết quả định tính trên cao methanol và cao hexan Diệp hạ châu bằng phương pháp chiết ngâm dầm cho thấy sự hiện diện của một số hợp chất thiên nhiên, gồm: alkaloid, flavonoid, steroid và triterpenoid, tannin, glycoside, saponin. Ngoài ra, nghiên cứu cũng chứng minh hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết methanol và hexan với giá trị IC<sub>50</sub> (Half-Maximal Inhibitory Concentration) lần lượt là 21.894 $\mu$ g/mL, 60.226 $\mu$ g/mL, cho thấy tiềm năng mở rộng ứng dụng cây Diệp hạ châu trong lĩnh vực bảo vệ sức khỏe.

**Từ khóa:** Diệp hạ châu, thành phần hóa học, kháng oxy hóa.

## 1. Đặt vấn đề

Diệp hạ châu (cây chó đẻ răng cưa) là loài cây mọc hoang tại nhiều nơi, khắp các tỉnh thành ở Việt Nam. Trong dân gian người ta sử dụng cây Diệp hạ châu đắng để chữa các bệnh viêm thận, phù thũng, sỏi thận, trẻ em suy dinh dưỡng, viêm ruột, kiết lỵ, viêm gan, điều kinh, lọc máu, điều huyết, ung nhọt, đẹn rầu, lở ngứa, rần rết cắn...[1] Các nghiên cứu về Diệp hạ châu chủ yếu tập trung vào phân lập một số alkaloid và đánh giá khả năng kháng khuẩn của lá cây Diệp hạ châu [2]. Vì vậy, bài viết sẽ định tính thành phần hóa học và khả năng kháng oxy hóa đối với toàn bộ rễ, thân, lá cây Diệp hạ châu thu hái trên địa bàn tỉnh Trà Vinh.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Diệp hạ châu đắng (Phyllanthus amarus schum.et thonn) được thu hái ở xã Huyền Hội,

huyện Càng Long, tỉnh Trà Vinh và cao chiết Diệp hạ châu. Sau khi lấy mẫu, mẫu được đưa về phòng thí nghiệm để khảo sát định tính thành phần hóa học và khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 *Chiết cao methanol và cao hexane Diệp hạ châu*

Diệp hạ châu sau khi được thu hái sẽ được rửa sạch và phơi khô, sau đó tiến hành cắt nhỏ với kích thước đồng đều. Cân khoảng 100 g diệp hạ châu cho vào túi vải đặt vào bình thủy tinh 1l, thêm methanol vào với lượng vừa đủ và tiến hành chiết ngâm dầm ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành chiết 2 lần với 24 giờ/lần chiết để chiết kiệt mẫu [3].

Thí nghiệm thực hiện tương tự với dung môi hexane.

2.2.2. *Khảo sát định tính thành phần hóa học cao chiết Diệp hạ châu*

Với mục đích đánh giá sơ bộ về thành phần hóa học của các cao chiết từ Diệp hạ châu, nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp hóa học để định tính các hợp chất tự nhiên có trong cao chiết bằng các thuốc thử. Các nhóm hợp chất được đánh giá bao gồm: alkaloid, flavonoid, steroid và triterpenoid, tannin, glycoside, saponin. Mẫu thử bao gồm dịch chiết và cao chiết hòa tan trong dung môi tùy vào từng phản ứng cụ thể [4].

❖ *Alkaloid*

Thuốc thử Mayer: Cân 1,36g  $HgCl_2$  hòa tan với 60mL nước cất thu được dung dịch 1. Cân 5g KI hòa tan với 10mL nước cất thu được dung dịch 2. Trộn dung dịch 1 và dung dịch 2 với nhau, cho vào bình định mức 100mL, dùng nước cất định mức đến vạch thu được thuốc thử mayer. Lấy 1mL dịch chiết cho vào ống nghiệm, sau đó nhỏ từ từ thuốc thử mayer vào, nếu có sự hiện diện của alkaloid sẽ cho phản ứng xuất hiện kết tủa màu trắng hoặc vàng nhạt.

❖ *Flavonoid*

Thuốc thử  $FeCl_3$  5%: Cân 0.88 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  hòa tan trong 10mL  $HNO_3$  5% thu được thuốc thử  $FeCl_3$  5%. Cho vào ống nghiệm 1mL dịch chiết, thêm vài giọt  $FeCl_3$  5%, nếu có sự hiện diện của flavonoid sẽ cho phản ứng xuất hiện kết tủa màu xanh đen.

Phản ứng với  $H_2SO_4$  đậm đặc: Khi cho  $H_2SO_4$  đậm đặc vào dịch chiết nếu có sự hiện diện của hợp chất flavonoid, thì:

- Flavon và flavonol cho phản ứng xuất hiện màu vàng đậm đến cam và có hiện tượng huỳnh quang.

- Chalcon, auron cho phản ứng xuất hiện màu đỏ hoặc đỏ lam.

- Flavanon cho phản ứng xuất hiện màu đỏ đến cam.

Cho vào ống nghiệm 1 mL dịch chiết, thêm vài giọt  $H_2SO_4$  đậm đặc.

❖ *Steroid và triterpenoid*

Thuốc thử Liebermann-Burchard: Cho 2mL Acetic anhydride vào cốc, thêm 2mL chloroform, làm lạnh, thêm 2 giọt  $H_2SO_4$  đậm đặc thu được thuốc thử Liebermann-Burchard. Hòa tan cao trong chloroform, lấy 1mL dịch này cho vào ống nghiệm, thêm từ từ vài giọt thuốc thử Liebermann-

Burchard vào, nếu có sự hiện diện của steroid và triterpenoid sẽ cho phản ứng xuất hiện màu xanh dương, lục, cam hoặc đỏ và màu này bền.

Phản ứng Salkowski: Hòa tan 1 - 2mg cao chiết trong 1mL chloroform và nhỏ thêm 1mL  $H_2SO_4$  đậm đặc, nếu có sự hiện diện của steroid và triterpenoid sẽ cho phản ứng xuất hiện màu đỏ đậm, xanh, xanh tím.

❖ *Tannin*

Thuốc thử Pb ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> bão hòa: Cho vào cốc 5 mL nước cất, thêm Pb ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> vào cho đến khi bão hòa thu được thuốc thử Pb ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> bão hòa. Cho vào ống nghiệm 1mL dịch chiết, thêm từ từ thuốc thử Pb ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> bão hòa vào, nếu có sự hiện diện của tannin sẽ cho phản ứng xuất hiện kết tủa.

❖ *Glycoside*

Thuốc thử Fehling:

Dung dịch Fehling 1: dung dịch  $CuSO_4$ .

Dung dịch Fehling 2: dung dịch muối kali natri tartrat.

Cho vào ống nghiệm vài giọt Fehling 1, vài giọt Fehling 2 theo tỷ lệ 1:1, lắc, thêm vài giọt dung dịch cao chiết rồi đem đun cách thủy. Nếu có sự hiện diện của glycoside sẽ cho phản ứng xuất hiện kết tủa đỏ gạch.

❖ *Saponin*

Phản ứng tạo bọt:

Ống nghiệm 1: thêm 5mL NaOH 0.1N và 1mL dịch chiết (pha trong alcol).

Ống nghiệm 2: thêm 5mL HCl 0.1N và 1mL dịch chiết (pha trong alcol).

Bật miệng 2 ống nghiệm lại, lắc mạnh và để yên khoảng 15 phút, sau đó quan sát. Nếu có sự hiện diện của saponin sẽ có hiện tượng tạo bọt bền.

2.2.3. *Đánh giá đặc tính kháng oxy hóa của cao chiết Diệp hạ châu bằng phương pháp DPPH*

❖ *Lựa chọn điều kiện thực hiện*

Có nhiều nghiên cứu cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại của DPPH 517nm. Dung môi dùng cho phản ứng phải hòa tan được cả DPPH và mẫu thử. Trong thí nghiệm này methanol được sử dụng làm dung môi cho phản ứng. Thời gian tối ưu cho phản ứng được chọn là 30 phút vì phần lớn các chất chống oxy đối chứng thường được dùng như: vitamin C, BHT.. cần khoảng 30 phút để phản ứng hòa toàn với gốc tự do của DPPH trong điều kiện thiếu sáng [5].

Chuẩn bị dung dịch DPPH: các dung dịch DPPH được pha trong methanol với các nồng độ khác nhau từ 0 - 100µg/mL, để 30 phút sau đó đo độ hấp thu ở bước sóng 517nm.

❖ *Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của vitamin C*

Chuẩn bị dung dịch vitamin C (dung dịch đối chứng): các dung dịch vitamin C được pha trong DPPH với các nồng độ từ 0 - 5µg/mL, để 30 phút trong điều kiện thiếu sáng, sau đó tiến hành đo độ hấp thu ở bước sóng 517nm.

❖ *Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết*

Chuẩn bị dung dịch cao chiết: các dung dịch cao chiết được pha trong methanol với các nồng độ từ 0 - 100µg/mL, cho các dung dịch cao chiết phản ứng dung dịch DPPH nồng độ 40µg/mL trong điều kiện thiếu sáng 30 phút. Sau đó tiến hành đo độ hấp thu của DPPH ở bước sóng 517nm.

❖ *Tính toán kết quả*

Khả năng khử gốc tự do DPPH của một chất chống oxy hóa được thể hiện qua phần trăm ức chế (%) và được tính theo công thức:

$$1\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Trong đó:  $A_c$  là độ hấp thu của dung dịch DPPH,  $A_s$  là độ hấp thu của dung dịch DPPH sau khi phản ứng với chất chống oxy hóa.

Khả năng kháng oxy hóa của một chất bằng phương pháp DPPH được thể hiện qua giá trị  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  là nồng độ của chất chống oxy hóa mà tại nồng độ đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do của DPPH,  $IC_{50}$  càng nhỏ thì hoạt tính kháng oxy hóa của chất càng cao. Giá trị  $IC_{50}$  được tính dựa vào

phương trình đường chuẩn của phần trăm ức chế và nồng độ của chất chống oxy hóa.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả điều chế cao chiết Diệp hạ châu

Sau khi chiết ngâm dầm với 2 dung môi methanol và hexane trong thời gian 24 giờ, thu được các cao methanol (7.01g) và cao hexane (1.06g). (Bảng 1).

Bảng 1. Hiệu suất chiết cao Diệp hạ châu

	Khối lượng Diệp hạ châu	Khối lượng cao chiết	Hiệu suất
Cao chiết methanol	79.25 g	7.007 g	8.84 %
Cao chiết hexan	82.22 g	1 06 g	1.29 %

#### 3.2. Kết quả khảo sát thành phần hóa học của cao chiết Diệp hạ châu

Kết quả khảo sát dinh tính thành phần hóa học của 2 loại cao chiết Diệp hạ châu được thể hiện ở Bảng 2 và 3.

Theo Bảng 2 cho thấy, cao methanol chứa các hợp chất: alkaloid, flavonoid, steroid và triterpenoid, tannin, glycoside, saponin.

Như vậy, cao hexane Diệp hạ châu chỉ chứa steroid và triterpenoid.

#### 3.3. Đánh giá đặc tính kháng oxy hóa của cao chiết Diệp hạ châu

##### 3.3.1. Đường chuẩn DPPH

Các dung dịch DPPH được pha trong methanol với các nồng độ 5 100µg/mL: 5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 75µg/mL, 100µg/mL. Sau đó

Bảng 2. Kết quả định tính thành phần hóa học của cao chiết methanol

Nhóm chức	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	Thuốc thử Mayer	Kết tủa vàng nhạt	+
Flavonoid	FeCl <sub>3</sub> 5%	Kết tủa xanh đen	+
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Kết tủa nâu đỏ	+
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard	Kết tủa màu lục	+
	Salkowski	Xuất hiện màu đỏ đậm	+
Tannin	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> bão hòa	Kết tủa vàng	+
Glycoside	Fehling	Kết tủa	+
Saponin	Phản ứng tạo bọt	Có bọt bền	+

Bảng 3. Kết quả định tính thành phần hóa học của cao chiết hexan

Nhóm chức	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	Thuốc thử Mayer	Không kết tủa	
Flavonoid	FeCl <sub>3</sub> 5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc	Không kết tủa Kết tủa nâu đỏ	+
Steroid và Triterpenoid	Liebermann-Burchard Salkowski	Màu xanh nhạt Xuất hiện màu đỏ đậm	+
Tannin	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> bão hòa	Không kết tủa	
Glycoside	Fehling	Không kết tủa	
Saponin	Phản ứng tạo bọt	Không bọt	

tiến hành đo độ hấp thu với máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 517nm tại thời điểm vừa pha xong và sau 30 phút [6].

Từ kết quả khảo sát, độ hấp thu của DPPH ổn định sau 30 phút ở nồng độ 40µg/mL. Do đó, nồng độ này sẽ được sử dụng trong thí nghiệm đánh giá khả năng kháng oxy hóa của 2 loại cao chiết.

3.3.2. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của Vitamin C

Đường chuẩn Vitamin C được pha với nồng độ từ 0 - 5µg/mL trong DPPH 40µg/mL (thực tế nồng độ DPPH pha Vitamin C là 44.873µg/mL), sau đó được đo độ hấp thu ở bước sóng 517 nm. (Kết quả trung bình 3 lần đo). (Hình 2).

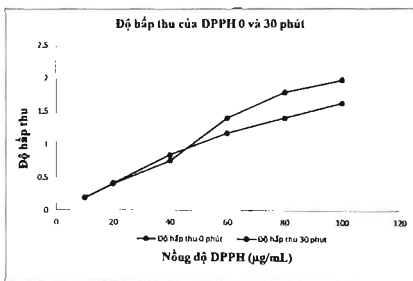
Dựa vào phương trình đường chuẩn Vitamin C, ta tính được giá trị IC50 của Vitamin C là 4.744 µg/mL.

3.3.3. Kết quả đo hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết Diệp hạ châu

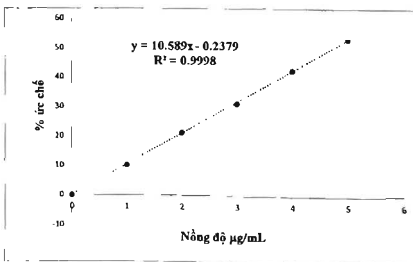
Khả năng kháng oxy hóa của 2 loại cao methanol và cao hexane Diệp hạ châu được thể hiện ở Hình 3.

Theo đồ thị, giá trị IC50 của cao chiết methanol và cao hexan lần lượt 21.894µg/mL là 60.226µg/mL. Với kết quả trên, để có được hiệu

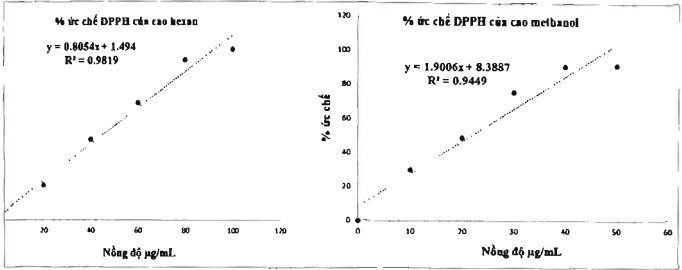
Hình 1: Độ hấp thu của DPPH ở 0 phút và 30 phút



Hình 2: Phần trăm ức chế DPPH của vitamin C



Hình 3: Phần trăm ức chế DPPH của cao chiết hexane (trái) và cao methanol (phải)



quả kháng oxy hóa của 1 viên vitamin C 500mg thì cần đến 2307.5mg (gấp 4.62 lần) cao methanol và cần 6347.6mg (gấp 12.7 lần) cao hexan Diệp hạ châu. So với một số cao chiết khác thì cao chiết diệp hạ châu có hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn nhiều như: IC50 của cao methanol lá lô hội là 137.49µg/mL [7], cao methanol bạch đầu ông là 127µg/mL [8].

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã chiết thành công 2 loại cao methanol và hexane Diệp hạ châu và khảo sát định

tính các thành phần hóa học có trong cao chiết. Trong đó, cao methanol có sự hiện diện của: alkaloid, flavonoid, steroid và triterpenoid, tannin, glycoside, saponin. Riêng cao hexane chỉ chứa steroid và triterpenoid.

Với kết quả đánh giá khả năng kháng oxy hóa in vitro trên 2 loại cao chiết methanol và cao hexane của cây Diệp hạ châu tại tỉnh Trà Vinh, nghiên cứu chỉ ra tiềm năng phát triển ứng dụng cây Diệp hạ châu trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe ■

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Đỗ Tất Lợi (1997). "Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam". NXB Y học, Hà Nội.
2. Nguyễn Trọng Tuấn, N.N.H. (2007). "Phân lập và nhận danh cấu trúc của alkaloid từ lá cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus Amarus Schum. Et Thonn*)". Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ. 7: p. 163 - 166.
3. Từ Gia Tín (2014). "Khảo sát định tính thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết lá saké (*artocarpus altilis*)". Khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ.
4. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). "Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ". NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
5. Tiêu chuẩn Quốc gia (2017), Thực phẩm - xác định hoạt độ chống oxy hóa bằng phản ứng với 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng; Bộ Khoa học và Công nghệ.
6. Om P. Sharma, T.K.B. (2009). "DPPH antioxidant assay revisited". Food Chemistry.
7. Nguyễn Thành Tài (2014). "Nghiên cứu khả năng chống oxy hóa và kháng vi sinh vật gây bệnh của cao chiết lá lô hội (*Aloe vera L.*)". Khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ.
8. Mai Văn Hiếu (2015), "Khảo sát định tính thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxy hóa của bạch đầu ông (*vernonia cinerea*)", Khoa Khoa học Tự nhiên - Đại học Cần Thơ.

Ngày nhận bài: 7/4/2019

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 17/4/2019

Ngày chấp nhận đăng bài: 27/4/2019

*Thông tin tác giả:*

1. ThS. NGUYỄN XUÂN THỊ DIỄM TRINH
  2. KS Hóa học. LÝ TRƯỜNG DŨ
  3. KS Hóa học. PHẠM HUỖNH NGÂN
- Trường Đại học Trà Vinh

## **IDENTIFYING CHEMICAL COMPONENTS AND ANTIOXIDATION ABILITY OF PHYLLANTHUS AMARUS SCHUM. ET THONN**

- Master. NGUYEN XUAN THI DIEM TRINH
  - Chemical Engineer LY TRUONG DU
  - Chemical Engineer PHAM HUYNH NGAN
- Tra Vinh University

### **ABSTRACT:**

This study is to identify the chemical compounds and evaluate the antioxidant activity of *Phyllanthus Amarus Schum. Et thonn*'s extraction which is collected at Huyen Hoi commune, Cang Long district, Tra Vinh province. The results show that there are several compounds in methanol and hexane extraction of *Phyllanthus Amarus Schum. Et thonn* including alkaloid, flavonoid, steroid and triterpenoid, tannin, glycoside, and saponin. Moreover, the study also reveals that the two extraction types of *Phyllanthus Amarus Schum. Et thonn* have a high antioxidant activity with the IC50 value of 21.894 $\mu$ g/mL, 60.226 $\mu$ g/mL, respectively. It proves that *Phyllanthus Amarus Schum. Et thonn* could be used as a functional food in health care application.

**Keywords:** *Phyllanthus Amarus Schum. Et thonn*, chemical components, antioxidant activity.