JSLHU JOURNAL OF SCIENCE OF LAC HONG UNIVERSITY
https://tapchikhdt.lhu.edu.vn
Tạp chí Khoa học Lạc Hồng 2019, 7, 099-102

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ ĐỊNH LƯỢNG POLYPHENOL TOÀN PHẦN TRONG LÁ TRẦU KHÔNG (*PIPER BETLE*, PIPERACEAE)

Study on antioxidant activity and quantification of total polyphenols from *Piper betle* leaves

Nguyễn Thị Tố Quỳnh[1,a], Nguyễn Thị Hồng Hạnh[2,b], Nguyễn Thị Như Quỳnh[3,c], Hoàng Đức Thuận[4,d],Lê Thị Thu Hồng[5,e]
[1,2,3,4,5] *Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam*
[c]*ds.nhuquynhnguyen@gmail.com*, [d]*hoangthuand08@gmail.com*, [e]*hongle5792@gmail.com*

TÓM TẮT. Trầu không là một dược liệu được sử dụng phổ biến trong tập tục nhai trầu của Việt Nam và được sử dụng để sát khuẩn, làm lành vết thương. Nhằm làm sáng tỏ thành phần hóa học và tác dụng sinh học của Trầu không, đề tài tiến hành xác định hàm lượng polyphenol toàn phần và hoạt tính chống oxy hóa của lá Trầu không. Kết quả khảo sát thành phần hóa học cho thấy trong dược liệu lá Trầu không chứa nhiều hợp chất polyphenol. Xác định hàm lượng polyphenol toàn phần bằng phương pháp Folin-Ciocalteu. Quy trình định lượng polyphenol toàn phần được thẩm định với độ lặp lại và độ đúng đạt (RSD < 5%); tỉ lệ phục hồi nằm trong giới hạn cho phép (95% - 105%). Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần trong Trầu không được xác định là 2,52% theo chuẩn gallic. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo phương pháp đánh bắt gốc tự do với thuốc thử DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Kết quả cho thấy dịch chiết toàn phần lá Trầu không cho hoạt tính chống oxy hóa với IC_{50} là 20,25 µg/ml, cao ethyl acetat cho hoạt tính mạnh nhất trong các cao với IC_{50} là 8,6 µg/ml.

TỪ KHÓA: *Folin-Ciocalteu, hoạt tính chống oxy hóa, Trầu không*

ABSTRACT. Piper betle is popular plant in the custom of chewing betel in Vietnam and used for antiseptic, wound healing. In order to research the biological affects, this scientific report presented the study on the total polyphenol content and antioxidant activity of Piper betle leaves by The Folin-Ciocalteu method (The results showed that the Piper betle leaves are rich in polyphenol compounds with 2,52% gallic acid equivalents; Validation results showed that the quantification method has good repeatability and accuracy with (RSD < 5%), recovery ratio from (95-105%) which are within acceptable limit). The other study on the antioxidant activity was realized by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl -DPPH- radical scavenging method (The results indicated that total Piper betle extract was efficient with 20,25 µg/ml of IC50, ethyl acetat's extract was the most efficient with 8,6 µg/ml of IC50.

KEYWORDS: *Folin-Ciocalteu, antioxidant, Piper betle*

1. GIỚI THIỆU

Xã hội càng phát triển thì vấn đề sức khỏe của con người ngày càng được quan tâm. Những vấn đề đến từ môi trường cũng như mặt trái của sự phát triển các ngành công nghiệp mang đến cho chúng ta nhiều mối nguy hại về sức khỏe: môi trường bị ô nhiễm nghiêm trọng, con người luôn căng thẳng trong công việc và học tập, việc ăn uống trở nên công nghiệp hóa là những nguyên nhân khiến cho sự gia tăng hình thành gốc tự do trong cơ thể con người. Theo các nghiên cứu, gốc tự do là nguyên nhân gây ra các bệnh nghiêm trọng, đáng kể nhất là: bệnh vữa xơ động mạch, ung thư, Alzheimer và lão hóa nhanh [1-5]. Chính vì vậy, việc loại bỏ gốc tự do trong cơ thể là giải pháp để bảo vệ sức khỏe con người trước nguy cơ của bệnh. Các hợp chất polyphenol phân bố rộng rãi trong thực vật, và là những chất chống oxy hóa mạnh với khả năng ngăn chặn, loại các gốc tự do [6]. Ngoài ra, polyphenol còn có nhiều hoạt tính sinh học khác như: kháng histamin, kháng khuẩn, kháng virus và kháng viêm.

Lá Trầu không là một dược liệu được sử dụng nhiều trong dân gian để làm lành vết thương, chống dị ứng với thành phần hóa học có nhiều polyphenol [7]. Hiện nay, các nghiên cứu trong nước về cây Trầu không còn hạn chế. Vì thế, đề tài tiến hành nghiên cứu xác định polyphenol toàn phần trong lá Trầu không và hoạt tính chống oxy hóa là cần thiết, nhằm góp phần làm sáng tỏ hoạt tính sinh học của Trầu không.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu:

Lá Trầu không được thu hái ở Biên Hòa, Đồng Nai vào tháng 01/2019. Mẫu cây được định danh với tên khoa học là *Piper betle*, Piperaceae và được lưu tại bộ môn Dược liệu – Đại học Lạc Hồng.

Hóa chất và dung môi:

Hóa chất và thuốc thử dùng trong phân tích sơ bộ thành phần hóa học: Dragengroff, Valse-Mayer, Hager, NaOH, $FeCl_3$, H_2SO_4,…

Dung môi - hóa chất sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa và định lượng polyphenol toàn phần: *n*-hexan, chloroform, ethyl acetat, methanol, DPPH đạt tiêu chuẩn phân tích.Thuốc thử Folin - Ciocalteu (Merck), natri carbonat do Trung Quốc sản xuất và acid gallic 98,00% do Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc – Mỹ phẩm – Thực phẩm tỉnh Phú Yên cung cấp.

Trang thiết bị:

Máy quang phổ UV-Vis Shimadzu 2550 với phần mềm UVProbe V. 1,11 (Japan).

Received: May, 31, 2019
Accepted: July, 25th, 2019
*Corresponding Author
Email: hongle5792@gmail.com

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thử nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa thực hiện với thuốc thử Folin Ciocalteu và Định lượng polyphenol toàn phần thực hiện với thuốc thử DPPH.

2.2.1 Chiết xuất dược liệu

Chuẩn bị cao sử dụng cho khảo sát hoạt tính chống oxy hóa: cân 50 g bột lá Trầu không (đã trừ độ ẩm) cho vào erlen nút mài, chiết với 500 ml MeOH 70%, siêu âm trong 30 phút tại 50 °C, thực hiện lặp lại 2 lần. Dịch chiết sau khi lọc được cô dung môi dưới áp suất thấp thu được cao toàn phần (TP). Cao này được giữ lại 1 phần để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Lượng cao TP còn lại được phân tán với nước sau đó lắc phân bố lỏng-lỏng bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần theo trình tự *n*-hexan (HEX), chloroform (CF), ethyl acetat (EA) (3 lần x 1 lít). Lượng dịch chiết còn là cao nước (N). Cô quay áp suất thấp thu được các cao phân đoạn tương ứng.

Chuẩn bị cao sử dụng cho định lượng polyphenol toàn phần: Cân 1 g bột khô lá Trầu không cho vào erlen 50 ml, thêm 20 ml MeOH vào, siêu âm trong 30 phút ở 50 ^{0}C, thực hiện 2 lần, gộp dịch chiết vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 5 ml dịch chiết cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi đến vạch, lắc đều. Bảo quản tránh ánh sáng.

2.2.2 Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật

Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật của dược liệu theo phương pháp Ciuley cải tiến [9].

Nguyên tắc: Chiết các chất có trong dược liệu thành 3 phân đoạn có độ phân cực tăng dần lần lượt với các dung môi: ether ethylic, ethanol và nước. Xác định các nhóm hợp chất trong từng dịch chiết bằng các phản ứng đặc trưng.

2.2.3 Xác định hoạt tính chống oxy hóa

Dùng 0,5 ml dung dịch DPPH (nồng độ 0,5 mM trong methanol, pha dùng trong ngày, bảo quản ở 4 °C), 0,5 ml dung dịch cao thử có nồng độ khác nhau cho vào 2 ml methanol. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 30 phút. Đo độ hấp thu ở bước sóng 517 nm. Thực hiện đồng thời mẫu trắng thay DPPH, mẫu thử bằng methanol. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Acid gallic được sử dụng làm chất đối chiếu[8].

Khả năng ức chế DPPH được tính theo công thức sau:

$$\%HTCO = \frac{OD_{chung} - OD_{thu}}{OD_{chung}}.100\ \%$$

Trong đó: $OD_{chứng}$: độ hấp thu của mẫu đối chứng (không chứa cao chiết); $OD_{thử}$: độ hấp thu của mẫu.

Xây dựng đường chuẩn y = ax + b với phần trăm ức chế DPPH ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính giá trị IC_{50} của acid gallic và các cao chiết.

2.2.4 Định lượng polyphenol toàn phần

Hàm lượng polyphenol được xác định dựa trên phương pháp Folin-Ciocalteu, đo quang phổ ở bước sóng 765 nm. Chất chuẩn được sử dụng là acid gallic 50 µg/ml. Hàm lượng polyphenol toàn phần được tính dựa trên phương trình đường chuẩn y = ax + b của chất chuẩn là acid gallic.

Công thức tính lượng hàm lượng P % (kl/kl) polyphenol toàn phần:

$$P\% = \frac{A_t}{A_c}.\frac{m_C.C\%}{m_t.(100-H)\%}.\frac{D_t}{D_c}.100$$

Trong đó: P%: hàm lượng polyphenol toàn phần, được biểu diễn bằng % khối lượng tương đương chuẩn acid gallic (g)/ khối lượng mẫu thử khô (g) (GAE/g DL); At: độ hấp thu của mẫu thử; A_c: độ hấp thu của mẫu chuẩn; m_c: khối lượng mẫu chuẩn (g); m_t: khối lượng mẫu thử (g); C%: độ tinh khiết cuả chuẩn acid gallic (%); D_t: độ pha loãng của mẫu thử; D_c: độ pha loãng của mẫu chuẩn.

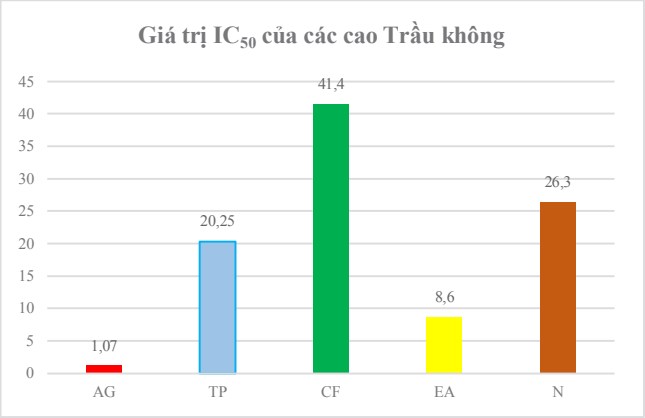
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật

Kết quả sơ bộ thành phần hóa học theo phương pháp Ciuley[9] cho thấy lá Trầu không có nhiều hợp chất polyphenol: flavonoid, tanin, triterpenoid. Ngoài ra, còn có các thành phần khác như acid hữu cơ, tinh dầu và hợp chất polyuronic.

3.2 Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxy hóa với thuốc thử DPPH trên cao toàn phần và các cao phân đoạn của lá Trầu không. Kết quả được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. *Biểu đồ so sánh giá trị IC_{50} các cao lá Trầu không*

Kết quả cho thấy dịch chiết toàn phần lá Trầu không có hoạt tính chống oxy hóa với IC_{50} là 20,25 µg/ml. Trong các cao phân đoạn cao ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 8,6 µg/ml, tuy nhiên yếu hơn acid gallic 8 lần với IC_{50} là 1,07 µg/ml.

3.3 Định lượng polyphenol toàn phần

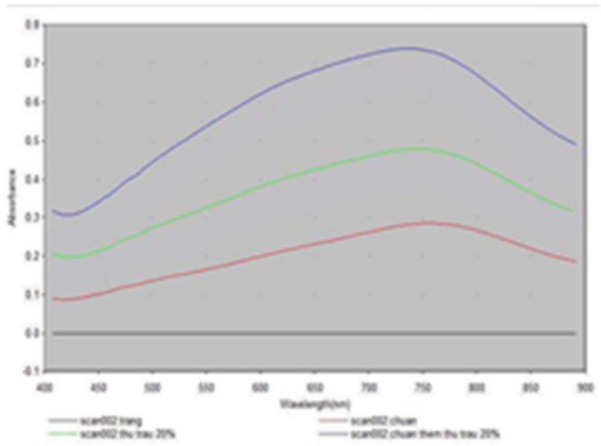
3.3.1 Thẩm định qui trình định lượng

Độ đặc hiệu: Thực hiện quét phổ trên 4 mẫu: mẫu thử, mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn.

Kết quả cho thấy mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn có đỉnh hấp thu cực đại tại bước sóng 765 nm. Ở mẫu trắng không có bước sóng hấp thu cực đại ở 765 nm.

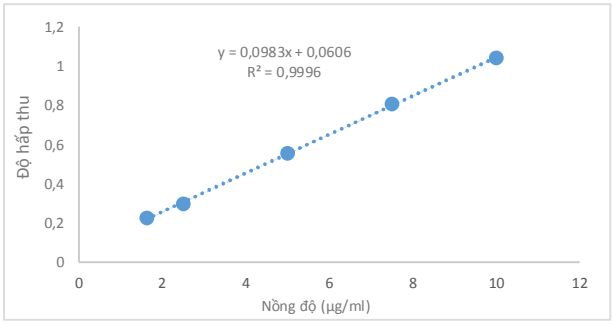
Nhận xét: có sự liên quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu của mẫu chuẩn acid gallic (µg/ml) theo phương trình y = 0,0983x + 0,0606 với R2 = 0,9996.

Độ đúng: Tỷ lệ phục hồi nằm trong giới hạn cho phép 90-105% với khoảng tin cậy là 95%.



Hình 1. *Đỉnh hấp thu của mẫu chuẩn và thử*

Tính tuyến tính



Hình 3. *Khảo sát tính tuyến tính của acid gallic*

Bảng 1*. Kết quả khảo sát độ đúng*

Mức chuẩn cho vào (%)	Tỉ lệ phục hồi (%)	RSD (%)
80	94,08	2,23
100	94,16	0,30
120	97,07	0,48

Độ lặp lại

Bảng 2. *Kết quả độ lặp lại mẫu thử*

Mẫu	Khối lượng dược liệu (g)	Độ hấp thu ở 750 nm	Hàm lượng (%)
1	1,0691	0,2485	2,19
2	1,0693	0,2467	2,17
3	1,0701	0,2440	2,15
4	1,0705	0,2441	2,15
5	1,0694	0,2466	2,17
6	1,0698	0,2445	2,15

Phương pháp có độ lặp lại đạt với RSD = 0,56% <5%.

3.3.2 Quy trình định lượng

Dung dịch chuẩn: cân chính xác 0,110 g acid gallic vào bình định mức 100 ml, thêm 30 ml nước cất, hòa tan hoàn toàn, đổ đầy nước cất đến vạch, trộn đều, được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg/ml. Hút chính xác 5 ml dung dịch trên vào bình định mức 100 ml, điền nước cất đến vạch, trộn đều. Dung dịch đối chiếu acid gallic có nồng độ 50 µg/ml. Bảo quản tránh ánh sáng.

Dung dịch thử: thực hiện theo mục 2.2.1.

Bảng 3. *Tiến hành định lượng polyphenol toàn phần*

	Mẫu trắng	Mẫu chuẩn	Mẫu thử
Dung dịch acid gallic 50 µg/ml	0	1	0
Dịch chiết	0	0	1
Nước cất	1	0	0
Thuốc thử FC	5	5	5
Lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút			
Dung dịch Na_2CO_3	4	4	4

Lắc đều để đồng nhất hỗn hợp. Để yên trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Đo mật độ quang ở 765 nm.

Bảng 4. *Kết quả xác định hợp chất polyphenol toàn phần có trong 1 g dược liệu theo chuẩn gallic*

Mẫu	Khối lượng mẫu thử (g)	Độ hấp thu	Hàm lượng Polyphenol toàn phần (%) theo chuẩn gallic
1	1,0744	0,2882	2,52
2	1,0745	0,2882	2,52
3	1,0744	0,2882	2,52
Hàm lượng polyphenol toàn phần 2,52%			

Kết quả thực nghiệm đã xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong lá Trầu không là 2,52% theo chuẩn acid gallic. Kết quả này cao hơn gấp 2 lần so với thử nghiệm trước đó của Tiara Putri tại Jakata (2013)[10].

4. KẾT LUẬN

Thành phần hóa học lá Trầu không chứa nhiều hợp chất polyphenol, ngoài ra còn có acid hữu cơ, tinh dầu, polyuronic. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong lá Trầu không được xác định là 2,52% theo chuẩn gallic. Dịch chiết toàn phần lá Trầu không cho hoạt tính chống oxy hóa với IC_{50} là 20,25 µg/ml và cao ethyl acetat có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 8,6 µg/ml.

5. LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện về cơ sở vật chất, cám ơn sự hướng dẫn tận tình của quý thầy cô bộ môn Dược liệu và Hóa hữu cơ giúp chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Toshio Hayashi, Akihisa Iguchi. Chapter 21 – Free radicals as Atherosclerotic risk relation to Nitrit oxide. *Biology and Pathobiology,* **2010**, 673-703.

[2] Laura C.D. Pomatto, Kelvin J.A Davies. Adaptive homeostastic and the free radical theory of ageing. *Free radical Biology and Medicine*, **2018,** 124, 420-430

[3] Kelvin J.A Davies. Free radicals and redox regulation in ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, **2019.**

[4] Pena-Bautista C., Baquero M., Vento M. , Chafer-Pericas C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Climica chimica Acta,* **2019**, 49, 85-90.

[5] Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C. J. , Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress – related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences,* **2017**, 38, 592-607.

[6] Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **1996**,

20(7), 933-956.

[7] Periyanayagam K, Jagadeesan M, Kavimani S, & Vetriselvan T. Pharmacognostical and Phyto-physicochemical profile of the leaves of *Piper betle* L. var Pachaikodi (Piperaceae) — Valuable assessment of its quality. Asian Pacific *Journal of Tropical Biomedicine,* **2012,** 2 (2, Supplement), 506-S510.

[8] Azrina, A., Nadiah, M. N., & Amin, I. Antioxidant properties of methanolic extract of *Canarium odontophyllum* fruit. *International Food Research Journal*, **2010**, 17(2), 319-326.

[9] Bộ môn Dược Liệu. Phương pháp nghiên cứu dược liệu, Đại học Y Dược TP. HCM, **2008**, 26-42.

[10] Tiara Putri et al. Total phenolic, flavonoids content and antioxidant activity of the ethanolic extract of Betel leaf (*Piper betle* L.). Published at The International Conference in Nanotechnology in Jakarta, **2013**.