

ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT VÀ TÁC DỤNG HẠ ĐƯỜNG HUYẾT CHỐNG OXY HÓA CỦA DỊCH CHIẾT HÚNG QUẾ

THE STUDY OF EXTRACTION CONDITIONS AND THE EFFECT OF REDUCING BLOOD
SUGAR AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GLUE EXTRACTED FROM BASIL

MÃ BÍCH NHƯ^(*)

TÓM TẮT: Húng quế (*Ocimum basilicum* var *thyrseiflora*) được sử dụng rộng rãi như một loại thảo dược. Khả năng kháng, khả năng ức chế enzyme thủy phân tinh bột của cao chiết húng quế cũng được xác định. Kết quả cho thấy, khi thay đổi điều kiện trích ly sẽ thu được hàm lượng phenolic tổng khác nhau. Điều kiện tối ưu (tỷ lệ mẫu dung môi là 1/100 và khuấy ở nhiệt độ 55⁰c) trong thời gian 35 phút với hàm lượng phenolic tổng thu được là 43.6 ± 0.03 mg GAE/g chất khô. Khả năng ức chế hoạt động của gốc tự do DPPH là 38.2 ± 1.1 %. Dịch chiết húng quế có khả năng ức chế đối với α -amylase và α -glucosidase tương đương 45.8 ± 0.82 %, 22.7 ± 1.1 %. Từ kết quả này, có thể thấy dịch chiết thu được từ húng quế có chứa các chất phenolic có khả năng kháng oxy hóa cao khi sử dụng điều kiện chiết thích hợp.

Từ khóa: húng quế; phenolic tổng; DPPH; α -amylase, α -glucosidase.

ABSTRACT: Basil (*Ocimum basilicum*) is widely used as an herb. Ability of resistance, inhibiting the starch hydrolytic enzyme of the glue extracted from basil had been determined. The results showed that, when changing extraction conditions, different total phenolic content would be obtained. Optimal conditions (with 1/100 sample solvent ratio, the duration of 35 min at the temperature of 55⁰c), obtaining the highest phenolic content is 43.6 ± 0.03 mg GAE / g dry matter. Ability of inhibiting the activity of free radical DPPH is 38.2 ± 1.1 %. Extracted liquid from basil has ability of inhibiting α -amylase and α -glucosidase equivalent to 45.8 ± 0.82 %, 22.7 ± 1.1 %. From this result, it can be seen that the liquid extracted from basil contains high antioxidant phenolic substances when appropriate extraction conditions are used.

Key words: Basil; total phenolic content; DPPH; α -amylase; α -glucosidase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường là bệnh mãn tính không lây lan do rối loạn chuyển hóa, đặc trưng bởi nồng độ glucose là nguyên nhân dẫn đến các biến chứng vi mạch như bệnh tim mạch, đột quỵ, mù và bệnh thận [1, tr.547-553]. Một phương pháp điều trị thực tế để kiểm soát bệnh tiểu đường là hạn chế tăng đường huyết sau ăn. Điều này có thể đạt được bằng ức chế enzyme thủy phân carbohydrate như α -

amylase và α -glucosidase, bởi vì hai enzyme này có vai trò quan trọng trong hệ thống tiêu hóa liên quan đến sự thủy phân tinh bột thành đường [2, tr.247-252]. Việc ức chế α -amylase và α -glucosidase có thể làm giảm đáng kể sự gia tăng đường huyết sau ăn do chỉ có thể hấp thụ monosacarit qua niêm mạc ruột, do đó làm giảm đường huyết ở bệnh nhân tiểu đường [3].

Một vài yếu tố khác đóng vai trò trong sinh bệnh học đái tháo đường như lipid máu

^(*) ThS. Trường Đại học Văn Lang, mabichnhu@vanlanguni.edu.vn, Mã số: TCKH22-13-2020

tăng và stress oxy hóa. Đặc biệt, stress oxy hóa là nguyên nhân hình thành các gốc tự do trong cơ thể và cũng là nguyên nhân chính dẫn đến kháng insulin, rối loạn lipid máu, rối loạn chức năng tế bào, giảm dung nạp glucose và cuối cùng dẫn đến bệnh đái tháo đường type 2 [4, tr.670-674]. Bằng cách bổ sung các chất oxy hóa tự nhiên có trong thực vật sẽ có tác dụng ngăn chặn sự tiến triển của bệnh đái tháo đường bởi vì các chất chống oxy hóa này có khả năng làm sạch các gốc tự do có hại cho cơ thể [4]. Để điều trị bệnh đái tháo đường, nhiều loại thảo dược có nguồn gốc tự nhiên đã được ưa chuộng vì chúng an toàn và ít độc hơn so với thuốc được tổng hợp [5, tr.1354-1360]. Hơn 400 loài thực vật có hoạt động hạ đường huyết đã được công bố, tuy nhiên việc tìm kiếm các loại thực vật mới vẫn luôn là sự quan tâm của các nhà khoa học. Ngoài trà xanh, khổ qua, giao cổ lam, thổ phục linh, dây thìa canh, húng quế... có tác dụng tốt trong điều trị đường huyết và chống oxy hóa. Tại Việt Nam, húng quế được sử dụng rộng rãi trong chế biến thức ăn và y học cổ truyền. Mục tiêu của bài viết này là tìm ra điều kiện tối ưu nhất để trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học từ húng quế. Việc sử dụng cao chiết của loại thảo dược này để thử hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase nhằm tạo ra các thuốc đặc hiệu hơn để chống bệnh tiểu đường từ nguồn dược liệu này.

2. NỘI DUNG

2.1. Nguyên liệu

Các hóa chất được sử dụng để phân tích tổng hàm lượng phenolic và khả năng chống oxy hóa bao gồm: methanol, thuốc thử Folin Ciocalteu, natri carbonate, axit gallic, rutin, 2 enzyme α -amylase và α -glucosidase, đệm citrate 0.01, pH 4, DNSA (3, 5-dinitrosalicylic acid), p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNNG) đều được mua từ Merk hoặc Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ. Húng quế tươi được mua tại một cơ sở ở Thành phố Hồ Chí Minh vào

khoảng tháng 9-10. Sau đó, mẫu được chần qua nước sôi trong thời gian 10 giây. Lá được sấy khô ở 50°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất mẫu thực vật

Lá khô được nghiền bằng máy xay IKA A11 và được bảo quản trong túi sạch trong bình hút ẩm cho đến khi phân tích. Việc chiết xuất lá húng quế theo phương pháp [6, 325-331]. Bột khô từ mẫu thực vật được chiết với 75% methanol và được trích ly thêm 2 lần nữa để chiết xuất hoàn toàn các hợp chất có hoạt tính sinh học.

2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất

Ảnh hưởng nhiệt độ đến hợp chất có hoạt tính sinh học: 35, 45, 55, 65°C;

Ảnh hưởng thời gian lắc đến hợp chất có hoạt tính sinh học: 10, 35, 60 và 75 phút;

Ảnh hưởng tỷ lệ mẫu và dung môi trích ly đến hợp chất có hoạt tính sinh học: 1:20, 1:50, 1:100, 1: 150, 1: 200 g/mL. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.3. Nghiên cứu khả năng ức chế enzyme α -glucosidase

Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase bởi cao chiết húng quế theo phương pháp [7]. Trước tiên, hỗn hợp phản ứng bao gồm 0.05 mL p-nitrophenyl α -D-glucoside (pNPG) (10 mg trong 2 mL phosphate buffer) và 0.01 mL cao húng quế với đệm phosphate 2.8 mL (pH 6,8). Sau đó, 0.02 mL của amyloglucosidase được thêm vào. Tiếp theo, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 60 phút, phản ứng được kết thúc ở nhiệt độ 90°C, trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm. Mẫu đối chứng buffer được thêm vào thay cho cao chiết thực vật. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase được tính bằng công thức:

$$\text{phần trăm ức chế (\%)} = \frac{1 - A_{405 \text{ mẫu thực vật}}}{A_{405 \text{ mẫu đối chứng}}} \times 100$$

2.2.4. Nghiên cứu khả năng ức chế enzyme α -amylase

Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của enzyme α -amylase bởi các cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Bhandari và cộng sự [3]. 0,5 mL cao trích hỗn hợp phản ứng trong 0,02 M dung dịch đệm natri phosphate pH 6,9. Hỗn hợp được ủ ở 25°C, trong 10 phút, thêm vào 1% tinh bột. Cuối cùng, thêm 1 mL của 96 mM dinitrosalicylic acid, dung dịch được ủ trong bể nước 95°C trong 1 phút. Hỗn hợp phản ứng được đo bằng máy đo quang phổ với bức sóng 540 nm. Tất cả các phép đo đều được thực hiện trong ba lần. Mẫu đối chứng được thực hiện bằng thuốc Acarbose. Khả năng ức chế enzyme α -amylase được tính bằng công thức:

$$\text{phần trăm ức chế (\%)} = \frac{1 - A_{540 \text{ mẫu thực vật}}}{A_{540 \text{ mẫu đối chứng}}} \times 100$$

2.2.5. Xác định phenolics tổng

Tổng hàm lượng phenolic trong dịch chiết được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu [8]. 300 μ L mẫu cao được pha loãng trộn với thuốc thử 300 μ L Folin-Ciocalteu. Sau 2 phút, 2,4 ml dung dịch natri cacbonat 5% đã được thêm vào. Mẫu sau đó được ủ 1 giờ ở 25°C trong bóng tối. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 760 nm. Axit gallic được sử dụng làm đường chuẩn.

2.2.6. Xác định tổng hàm lượng flavonoid

Tổng hàm lượng flavonoid trong mẫu chiết được xác định bằng phương pháp so màu

nhôm clorua của Chang et al [9] với một số sửa đổi nhỏ. 0,5 ml dịch chiết được thêm vào 1,5 ml ethanol 95%, 0,1 ml nhôm clorua 10%, 0,1 ml kali axetat và 2,8 ml nước cất. Hỗn hợp này sau đó được ủ ở nhiệt độ môi trường trong 30 phút. Cuối cùng, độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 415 nm. Hiệu chuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch rutin với nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 g/mL.

2.2.7. Xác định khả năng loại gốc tự do

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo mô tả bởi Huang et al [8, tr.669-675]. Đầu tiên, 0,1 ml dịch chiết được thêm vào 3,9 ml DPPH. Sau đó, hỗn hợp được giữ trong tối ở nhiệt độ phòng. Sau 30 phút, hỗn hợp được đo bằng máy quang phổ ở 515nm. Phần trăm quét gốc tự do được tính theo phương trình sau:

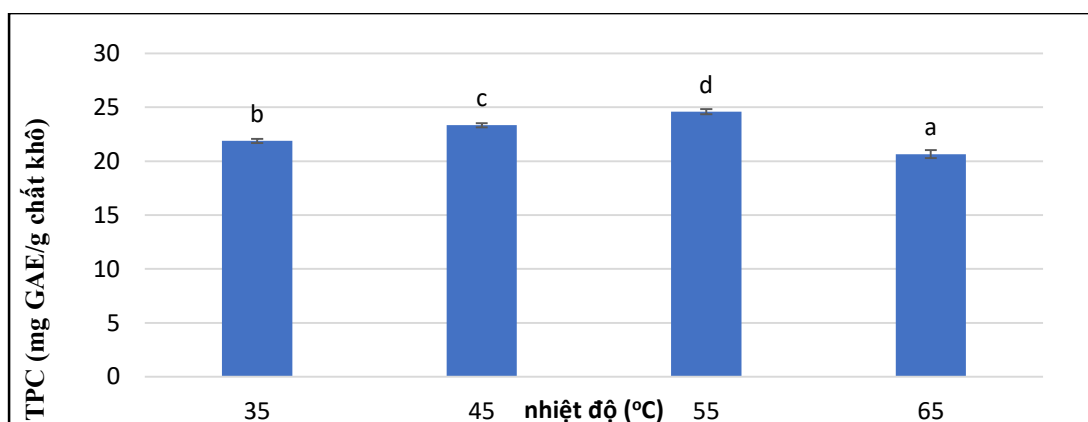
$$\text{Phần trăm quét gốc tự do (\%)} = \frac{(A_{\text{trắng}} - A_{\text{mẫu}}) \times 100}{A_{\text{trắng}}}$$

Trong đó: $A_{\text{trắng}}$: là độ hấp thụ của mẫu trắng; $A_{\text{mẫu}}$: là độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng có mẫu thử. Thí nghiệm được lặp lại ba lần, tính kết quả trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất

3.1.1. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hợp chất có hoạt tính sinh học



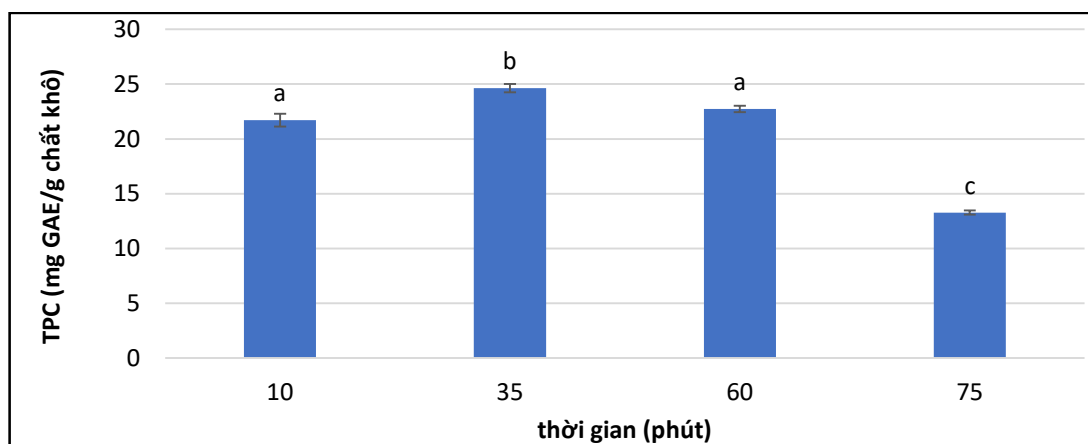
Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng phenolic tổng (TPC)

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c và d) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Nhiệt độ khác nhau ảnh hưởng đáng kể đến tổng hàm lượng phenolic tổng (TPC) của dịch chiết như trong Hình 1. Chiết xuất ở 35°C cho TPC thấp hơn so với 55°C (21,88 mg GAE/g trọng lượng khô và 24,59 mg GAE/g trọng lượng khô, tương ứng). Bởi vì nhiệt độ càng cao, polyphenol và dung môi dễ hòa tan vào nhau, lượng polyphenol sẽ trích ly ra nhiều hơn, việc tăng nhiệt độ thích hợp có thể làm giảm độ nhớt và dẫn đến sự gia tăng các hệ số khuếch tán của các chất hòa tan. Mặt khác, nhiệt giúp cho quá trình trích ly dễ dàng bằng cách phá hủy màng tế bào bởi việc làm biến tính màng tế bào và sự hình

thành các bọt khí, nó làm tăng khả năng hòa tan của bột húng quế cần trích ly. Nhiệt độ trích ly quá thấp, hiệu suất trích ly không cao vì hàm lượng polyphenol trong bã còn nhiều. Do đó, nhiệt độ tác động phức tạp đến phenolic tổng, khi tăng nhiệt độ cũng tăng hiệu suất trích ly. Tuy nhiên, nhiệt cao như 65°C trở lên sẽ gây tác động ngược lại bởi việc làm biến tính sản phẩm trích ly [10, tr.159-169]. Vì vậy, trong khảo sát này chúng tôi chọn nhiệt độ để trích ly polyphenol từ húng quế là 55°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng thời gian lắc đến hợp chất có hoạt tính sinh học



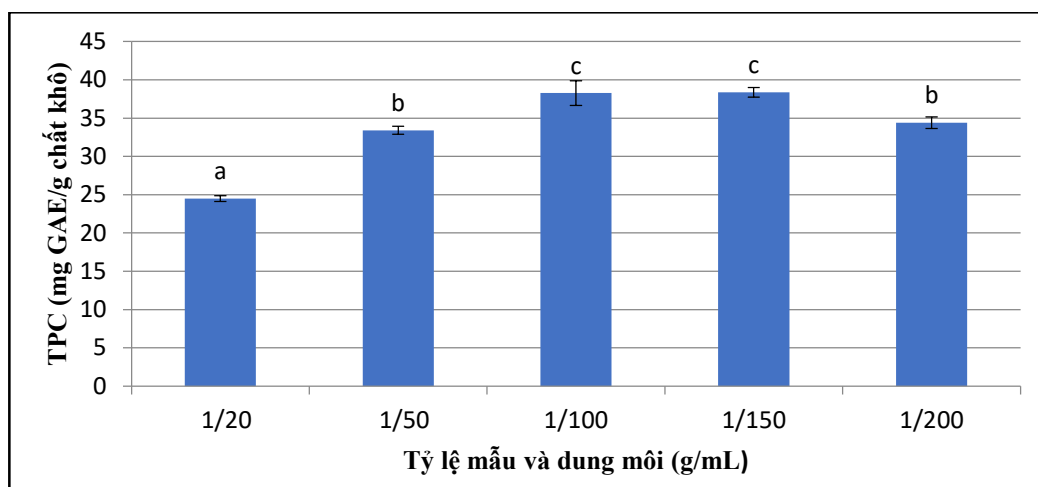
Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian lắc đến hàm lượng phenolic tổng (TPC)

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b và c) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Cố định nhiệt độ 55°C, ảnh hưởng của thời gian lắc lên tổng hàm lượng phenol được thể hiện trong hình 2. TPC chất chiết xuất có thời gian lắc khác nhau có sự khác biệt đáng kể. TPC cao nhất của dịch chiết thu được sau 35 phút lắc (24,6 mg GAE/g chất khô). Lúc đầu, TPC của dịch chiết thấp hơn so với các mẫu khác vì quá trình chiết cần nhiều thời gian lắc hơn để thu được nhiều hợp chất phenol hòa tan trong dung môi. Do đó, sự kéo dài của thời gian kéo theo sự gia tăng hiệu suất trích ly, nhưng không nên kéo dài vì điều này sẽ làm giảm hiệu suất trích ly, bởi vì polyphenol trong bã ngày càng giảm. Thời gian tối ưu là 35 phút.

3.1.3. Ảnh hưởng tỷ lệ mẫu và dung môi trích ly đến hợp chất có hoạt tính sinh học

Khi tăng tỷ lệ nguyên liệu (dung môi), TPC cũng tăng dần. Khi tăng tỷ lệ nguyên liệu (dung môi từ 1:20 lên 1:150), TPC tăng 14 mg GAE/g chất khô (tăng 1.58 lần). Với tỷ lệ dung môi 1:100 và 1:150 sẽ cho hàm lượng cao nhất TPC. Kết quả này có thể được giải thích bằng nguyên tắc chuyển khối giữa chất rắn và dung môi, sự thay đổi nồng độ giữa tế bào thực vật bên trong và dung môi [10, tr.159-169]. Nghiên cứu trước đây cũng cho biết tỷ lệ 1/100 là tối ưu để chiết xuất tổng phenolics và flavonoid từ húng quế bằng dung môi nước [11, tr.864-870]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ mẫu/dung môi 1:100 hoặc 1:150 là điều kiện tốt nhất để có được TPC cao.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu và dung môi đến hàm lượng phenolic tổng (TPC)

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b và c) chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.2. Xác định tổng hàm lượng flavonoid, phenolic tổng và khả năng loại gốc tự do trên húng quế trích ly điều kiện tối ưu

Bảng 1. Tổng hàm lượng flavonoid, phenolic tổng và khả năng loại gốc tự do trên húng quế trích ly điều kiện tối ưu

Hợp chất có hoạt tính sinh học	Giá trị
TPC	43.6 ± 0.03 mg GAE/g chất khô
TFC	$10.2 \pm 0,05$ mg RE/g chất khô
DPPH	38.2 ± 1.1 %

Giá trị TPC, TFC và DPPH của dịch chiết từ lá húng quế ở điều kiện tối ưu được thể hiện trong bảng 1. Giá trị TPC là $43,6 \pm 0,03$ mg GAE/g chất khô, cao hơn giá trị được báo cáo [12, tr.85-91] trích ly TPC từ 15 loài húng quế khác nhau. Kết quả này có thể do khác biệt loài *Ocimum* và điều kiện chiết xuất. Kết quả cũng chỉ ra rằng giá trị TFC của dịch chiết là $10,2 \pm 0,05$ mg RE/g chất khô, thấp hơn giá trị được báo cáo. Ngoài ra, khả năng loại gốc tự do DPPH của dịch chiết là $38,2 \pm 1,1\%$. Một nghiên cứu trước đây cũng cho biết khả năng loại gốc tự do DPPH của *Ocimum basilicum* dao động từ 19,23 đến 89,46% [11, tr.864-870].

3.3. Khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase

Bảng 2. Tỷ lệ phần trăm (%) khả năng ức chế hai loại enzyme từ cao chiết húng quế

Khả năng ức chế enzyme	Giá trị
α -amylase	45.8 ± 0.82 %
α -glucosidase	$22.7 \pm 1.1\%$

Khả năng ức chế của 2 enzyme α -amylase và α -glucosidase từ cao húng quế được thể hiện trong bảng 2. Khả năng ức chế các enzyme thủy phân tinh bột được giải thích là do các hợp chất phenolic phản ứng với protein tạo thành phức chất không hòa tan, dẫn đến sự biến dạng của enzyme, do đó ngăn cản khả năng liên kết với chất nền để giải phóng đường hấp thụ [12, tr.85-91]. So sánh với nghiên cứu của Lam và Phạm [13, tr.439-445], hàm lượng flavonoid của mướp đắng, đặc biệt là hàm lượng charantin, có thể làm giảm lượng đường trong máu, tương tự chức năng của insulin. Khả năng ức chế enzyme thủy phân tinh bột từ cao húng quế khá cao.

4. KẾT LUẬN

Điều kiện chiết tối ưu các hợp chất có hoạt tính sinh học từ húng quế là: tỷ lệ dung môi mẫu (g/mL) là 1/100, thời gian lắc 35 phút và nhiệt độ 55°C . Cao chiết từ húng quế ở điều kiện tối ưu có khả năng kháng 2 loại enzyme α -amylase và α -glucosidase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Asmat, U., K. Abad, and K. Ismail (2016), *Diabetes mellitus and oxidative stress*, A concise review, Saudi Pharmaceutical Journal.
- [2] Bhandari, M.R., et al (2008), α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.), Food Chemistry.
- [3] El-manawaty, M. and L. Gohar (2018), *In vitro alpha-glucosidase inhibitory activity of egyptian plant extracts as an indication for their antidiabetic activity*, In vitro.
- [4] Dhasarathan, P. and P. Theriappan (2011), *Evaluation of anti-diabetic activity of Strychnos potatorum in alloxan induced diabetic rats*, J Med Med Sci.
- [5] Ramesh, K., G. Devegowda, and H. Khosravinia (2006), *Effects of enzyme addition to broiler diets containing varying levels of double zero rapeseed meal*, Asian-australasian journal of animal sciences.
- [6] Van Hung, P. and N. Morita (2008), *Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities*, Food chemistry.
- [7] Pistia-Brueggeman, G. and R.I. Hollingsworth (2001), *A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors*, Tetrahedron.
- [8] Thaipong, K., et al (2006), *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*, Journal of food composition and analysis.
- [9] Chang, C.-C., et al (2002), *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*, Journal of food and drug analysis.
- [10] Nguyen, N.Q. and T.Q. Dang (2017), *Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Pigments from Annatto Seeds (Bixa Orellana) Using Response Surface Methodology*, EC Nutrition.
- [11] Izadiyan, P. and B. Hemmateenejad (2016), *Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design*. Food chemistry.
- [12] Hossain, M., et al (2010), *Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs*, Food Chemistry.
- [13] Lam, Q. T and Pham, V. H (2016), *Extraction and determination of inhibitory capacity against starch-hydrolyzing enzymes and antioxidant capacity of crude extract of Momordica Charantia*, Journal of Biotechnology.

Ngày nhận bài: 17-01-2020. Ngày biên tập xong: 13-7-2020. Duyệt đăng: 24-7-2020