

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA CỦA CAO CHIẾT PHÂN ĐOẠN TỪ CÂY NGẢI CỨU BẰNG PHƯƠNG PHÁP DPPH VÀ PFRAP

Hoàng Thành Chí⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 28/02/2022 ; Ngày phản biện 29/02/2022; Chấp nhận đăng 30/5/2022

Liên hệ Email: chiht@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2022.05.340>

Tóm tắt

Mục đích của nghiên cứu này là để xác định hoạt tính kháng oxy hóa in vitro của bốn cao chiết phân đoạn theo độ phân cực khác nhau của cây ngải cứu (*Artemisia vulgaris*) gồm có cao chiết n-hexan, chloroform, etyl axetat, và nước. Nghiên cứu được tiến hành bằng cách sử dụng hai thử nghiệm là DPPH (2,2 diphenylpicryl-hydrazyl) và thử nghiệm đánh giá năng lực khử sắt kali ferricyanide của bốn loại cao chiết phân đoạn ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy, so với các phân đoạn khác, cao chiết etyl axetat và nước đã cho thấy có tiềm năng kháng oxy hóa vượt trội trong thử nghiệm DPPH. Trong khi đó ở thử nghiệm đánh giá năng lực khử sắt thì khi nồng độ của cao chiết phân đoạn tăng lên thì khả năng khử sắt cũng tăng theo.

Từ khóa: cao chiết phân đoạn, DPPH, ngải cứu, phương pháp khử sắt

Abstract

INVESTIGATING THE ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF WORMWOOD EXTRACT FRACTIONS USING THE DPPH AND PFRAP METHODS

The purpose of this study was to determine the in vitro antioxidant activity of four different fractions of *Artemisia vulgaris* (n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and aqueous). Our research investigated at various concentrations using two primary models: the DPPH (2.2 diphenylpicryl-hydrazyl) assay and the potassium ferricyanide reducing power assay. In comparison to other fractions, ethyl acetate and aqueous extract demonstrated superior antioxidant potential in the DPPH assay. When determining the reducing ability, as the fraction concentration increases, the reducing power also increases.

1. Đặt vấn đề

Một phân tử tồn tại một hoặc nhiều electron chưa ghép đôi trong quỹ đạo nguyên tử của nó được gọi là gốc tự do, các gốc này được hình thành thông qua sự phá vỡ liên

kết hóa học, chẳng hạn như thông qua phản ứng oxy hóa khử (Lobo và nnk., 2010; Pham-Huy và nnk., 2008). Một số gốc tự do không ổn định, chúng có thể cho hoặc nhận thêm điện tử, vì vậy chúng vừa có tính khử vừa có tính oxy hóa. Chúng thường có tác động xấu đến màng tế bào, axit nucleic, hoạt động của protein, có thể dẫn đến stress oxy hóa và tổn thương tế bào (Lobo và nnk., 2010). Điều này lâu dài làm phát sinh các bệnh khác nhau chẳng hạn như hội chứng suy hô hấp cấp tính, bệnh Alzheimer, tiểu đường và đặc biệt là ung thư (Reuter và nnk., 2010). Tuy cơ thể cũng có các cơ chế để trung hòa các gốc tự do này (Lobo và nnk., 2010), nhưng để thúc đẩy quá trình này nhanh hơn thì xu hướng hiện nay trên thế giới là đẩy mạnh việc tiêu thụ thực phẩm giàu chất chống oxy hóa. Hiện nay, nguồn tài nguyên của các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên vẫn chưa được khám phá đầy đủ, nên nhu cầu về khám phá hoạt tính kháng oxy hóa của các hợp chất tự nhiên vẫn rất cần được nghiên cứu.

Chi *Artemisia* là một trong những chi chứa nhiều loài nhất và có độ phân bố rộng rãi nhất trong họ Cúc (Compositae) (Wright, 2002). *Artemisia vulgaris*, tên thường gọi là Ngải cứu, được tìm thấy lần đầu tiên ở Châu Âu và hiện đã xuất hiện ở rất nhiều nơi trên thế giới (Barney và nnk., 2003). *A. vulgaris* được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm thương mại vì có mùi hương nồng nàn và vị đặc trưng, cay và đắng. Trong y học cổ truyền, ngải cứu được dùng để điều trị một số bệnh và trị các triệu chứng như ho, cảm lạnh, mụn nhọt, và chủ yếu là cầm máu (chữa lành vết thương hoặc điều hòa kinh nguyệt). Ngải cứu đã được phát hiện là có nhiều hoạt tính sinh học đa dạng, bao gồm các hoạt tính kháng viêm, kháng u, chống co thắt, kháng khuẩn, chống sốt rét, kháng nấm và chống oxy hóa (Abiri và nnk., 2018). Để tìm ra cơ chế liên quan giải thích cho những đặc tính này, một số đặc điểm về hóa thực vật của ngải cứu đã được nghiên cứu và xác định. Các hợp chất hiện diện nhiều nhất trong tinh dầu là thujone, 1,8-cineole, borneol và camphor, nhưng các thành phần và sản lượng rất khác nhau giữa các nghiên cứu, phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố địa lý (Abiri và nnk., 2018). Các nghiên cứu về thành phần hóa học trên toàn cây ngải cứu cho thấy ở loài này nhóm hợp chất hiện diện chủ yếu là nhóm flavonoid và axit phenolic (Ekiert và nnk., 2020). Các hợp chất này đã được chứng minh là có khả năng kháng oxy hóa tốt trong các loại mô hình thí nghiệm khác nhau (Heim và nnk., 2002; Hernández và nnk., 2009).

Một số các nghiên cứu trước đây về đặc tính chống oxy hóa của ngải cứu tập trung nhiều vào tinh dầu của cây này. Cao chiết xuất thô của ngải cứu bằng các phương pháp khác nhau bao gồm chiết cổ điển, chiết siêu âm, chiết Soxhlet được phát hiện là có hiệu quả cao trong việc loại bỏ các gốc DPPH có giá trị EC₅₀ ở $22,2 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$; $26,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$; $28,1 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$, tương ứng (Karabegović và nnk., 2011). Một số nghiên cứu cũng so sánh tiềm năng kháng oxy hóa giữa chiết xuất metanol và tinh dầu của ngải cứu. Nhóm nghiên cứu rút ra kết luận rằng chiết xuất metanol có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh hơn nhiều so với tinh dầu (Pandey và nnk., 2017). Mặc dù vậy, nghiên cứu về khả năng kháng oxy hóa của phân đoạn có độ phân cực khác nhau từ cây ngải cứu vẫn chưa được thực hiện do đó nghiên cứu này đã được tiến hành.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và chuẩn bị nguyên liệu

Dịch chiết metanol thô của ngải cứu (Ly và nnk., 2020) được pha với nước và phân đoạn với các dung môi theo độ phân cực tăng dần, từ n-hexan tiếp theo là chloroform (CHCl_3) và sau đó bằng ethyl axetat (EtOAc) và cuối cùng là nước. Hexan, CHCl_3 , EtOAc và chiết xuất dạng nước được cô đặc bằng cách sử dụng máy cô quay chân không để tạo ra các phân đoạn tương ứng.

2.2. Phương pháp DPPH (2,2 diphenylpicryl-hydrazyl)

DPPH là một gốc tự do ổn định điển hình với 1 điện tử tự do làm cho dung dịch DPPH thay đổi màu sắc, từ vàng nhạt đến tím đậm, có độ hấp thụ mật độ quang mạnh ở bước sóng 517nm (Kedare và nnk., 2011). Do đó, việc đánh giá độ hấp thụ của chất này có thể gián tiếp khảo sát khả năng chống oxy hóa của dịch chiết. Cao chiết ở các nồng độ khác nhau (0 đến 200 $\mu\text{g/mL}$) được thêm vào dung dịch DPPH 0,3mM, ủ ở 37°C trong 30 phút, trong điều kiện tối. Độ hấp thụ OD được ghi nhận ở bước sóng 517nm. Vitamin C được sử dụng làm chất chuẩn, dung môi được sử dụng làm mẫu chứng âm. Phần trăm đo khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ Trung hòa gốc tự do DPPH} = [(A_0 - A_s)/A_0]$$

Trong đó, A là độ hấp thụ của mẫu trắng và A_s là độ hấp thụ của mẫu.

2.3. Phương pháp đánh giá năng lực khử sắt

Năng lực khử của cao chiết được đánh giá thông qua khả năng khử kali ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) để tạo thành kali ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), dẫn đến tạo thành dung dịch màu xanh lam. Trong bài nghiên cứu này chúng tôi áp dụng quy trình của thử nghiệm đã được mô tả trước đó với một vài sửa đổi nhỏ (Singh và nnk., 2012). Theo đó dung dịch phản ứng được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng với 10ml đệm axetat (300mmol/l, pH 3,6), 1ml TPTZ (10mmol/l trong 40mmol/l HCl) và 1ml clorua sắt (20mmol/l), sử dụng ngay trong vòng 3 giờ. 10 μl dung dịch Trolox (75% etanol) hoặc chiết xuất phân đoạn (nồng độ từ 0 đến 3200 $\mu\text{g/ml}$) được thêm 240 μl dung dịch phản ứng ở trên, ủ ở 37°C trong khoảng 5 phút sau đó tiến hành đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 593nm.

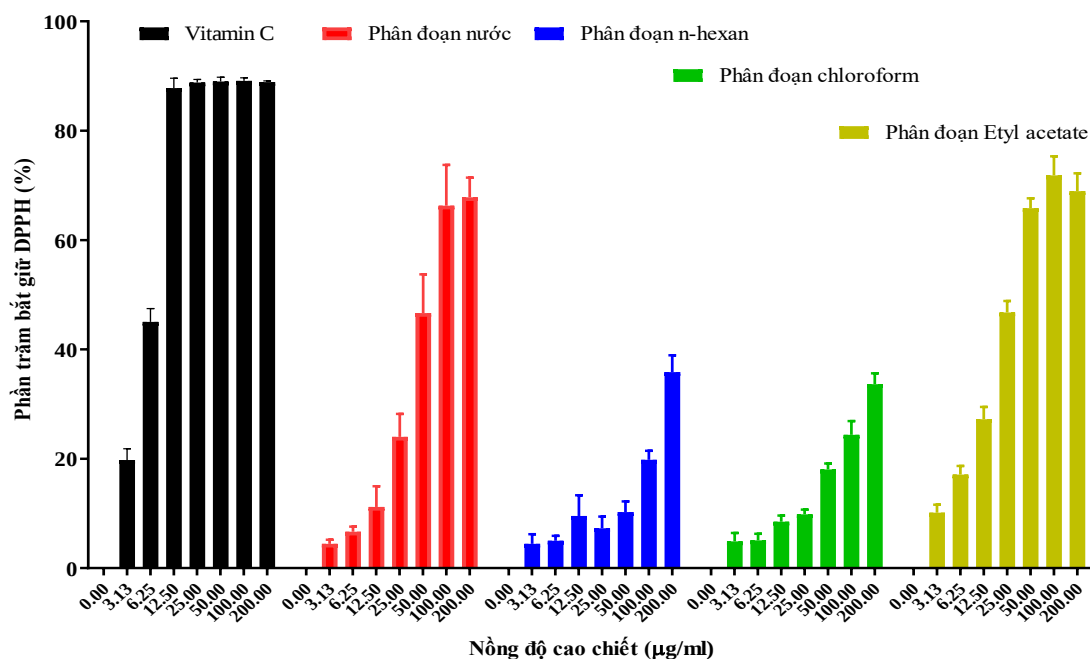
2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Mỗi thử nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần. Giá trị EC_{50} được tính bằng phần mềm Graphpad Prism phiên bản 9.0. Sự khác biệt đáng kể được xác định bởi giá trị p với giá trị p nhỏ hơn 0,001 (****), 0,01 (***), 0,1 (**) và 0,5 (*). Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Thử nghiệm DPPH được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu để đánh giá khả năng kháng oxy hóa của hợp chất liên quan nhằm sàng lọc sơ bộ chọn ra các hợp chất có tiềm năng.

Kết quả khảo sát thử nghiệm DPPH với các phân đoạn chiết mẫu được tổng hợp trong Hình 1. Giá trị EC_{50} của các phân đoạn có sự dao động khá đáng kể theo ghi nhận trong bảng 1.



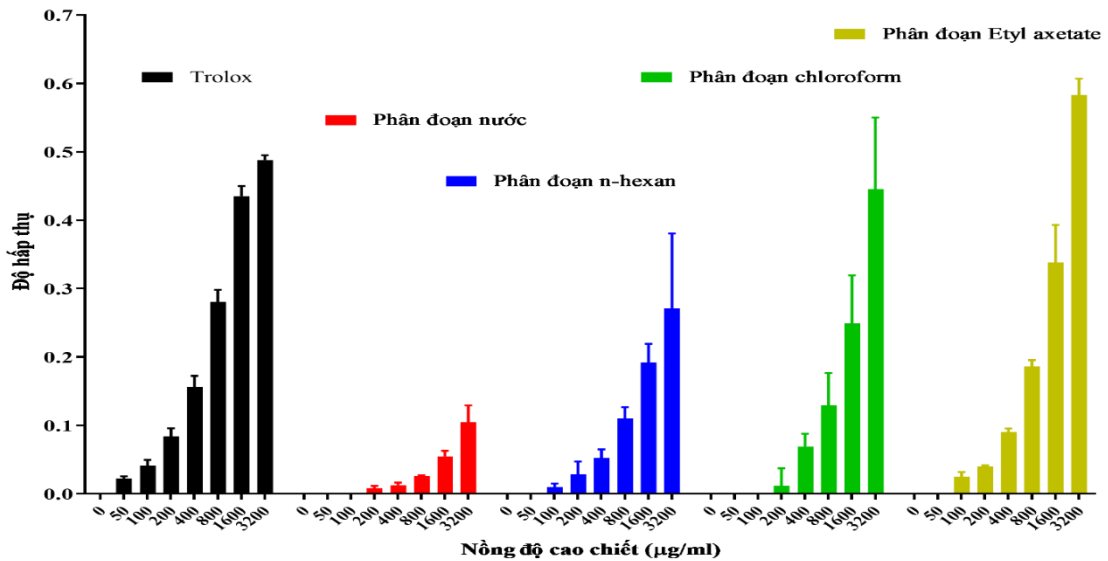
Hình 1. Hoạt tính kháng oxy hóa của các phân đoạn Ngải cứu đo bằng phương pháp DPPH

Bảng 1. Giá trị EC_{50} của cao chiết phân đoạn ngải cứu bằng phương pháp DPPH

Tên chất	Giá trị EC_{50} (µg/mL)
Vitamin C	6,39 ± 0,42
Phân đoạn n-Hexan	461,40 ± 73,98
Phân đoạn chloroform	> 500
Phân đoạn Etyl axetate	34,71 ± 2,92
Phân đoạn nước	66,86 ± 4,68

Nhìn chung, việc tăng nồng độ của cao chiết hoặc vitamin C đều dẫn đến tăng tỷ lệ trung hòa gốc tự do DPPH. Đáng chú ý là kết quả chỉ ra rằng dung môi phân cực (etyl axetate và nước) có thể chứa nhiều hợp chất sinh học có tác dụng kháng oxy hóa nhiều hơn các hợp chất được chiết xuất từ dung môi không phân cực. Giá trị EC_{50} của cao chiết etyl axetate và của nước đo được trong nghiên cứu lần này cho thấy có giá trị tương đối cao hơn so với giá trị của dịch chiết metanol tổng số ở một nghiên cứu trước đó của nhóm chúng tôi (Giá trị EC_{50} là $145,10 \pm 6,34 \mu\text{g/ml}$ cho cao chiết methanol thô) (Ly và nnk., 2020), do đó các phân đoạn có thể chứa lượng hợp chất có hoạt tính sinh học kháng oxy hóa lớn hơn so với dịch chiết thô.

Khả năng khử của một hợp chất cũng được xem xét là một tiêu chí tham khảo về khả năng kháng oxy hóa của hợp chất đó. Kết quả của thí nghiệm khảo sát khả năng khử của các cao chiết phân đoạn (PFRAP) đã được ghi nhận tại hình 2.



Hình 2. Năng lực khử sắt các cao chiết phân đoạn từ ngải cứu

Độ hấp thụ quang phổ tăng khi nồng độ dịch chiết tăng lên, điều này phản ánh rằng năng lực khử của các cao chiết tỷ lệ thuận với nồng độ của dịch chiết. Đáng chú ý, năng lực khử của phân đoạn cao nước là thấp nhất so với các phân đoạn khác, trong khi đó phân đoạn etyl axetate được ghi nhận có năng lực khử mạnh nhất. Một nghiên cứu khác cũng đã quan sát thấy sự khác biệt về dữ liệu giữa hai phương pháp. Giá trị EC₅₀ của dịch chiết metanol thô của ngải cứu là $48,77 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$, trong khi giá trị EC₅₀ của tinh dầu ngải cứu là $63,82 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ trong cùng thử nghiệm DPPH. Mặt khác, đối với năng lực khử sắt, giá trị EC₅₀ của cao chiết methanol thô và tinh dầu lần lượt là $296,44 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ và $380,43 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ (Pandey và nnk., 2017).

Tóm lại, trong số bốn phân đoạn khác nhau, chiết xuất ethyl acetate và chiết xuất nước cho thấy có nhiều tiềm năng kháng oxy hóa hơn trong phản ứng trung hòa gốc tự do DPPH. Trong thử nghiệm đánh giá năng lực khử thì khi tăng nồng độ của cao chiết phân đoạn chúng tôi nhận thấy năng lực khử của các phân đoạn của tăng theo tương ứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abiri, R., Silva, A. L. M., de Mesquita, L. S. S., de Mesquita, J. W. C., Atabaki, N., de Almeida Jr, E. B., . . . Malik, S. (2018). Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Research International*, 109, 403-415.
- [2] Barney, J., & DiTommaso, A. (2003). The biology of Canadian weeds. 118. *Artemisia vulgaris* L. *Canadian journal of plant science*, 83(1), 205-215.
- [3] Ekiert, H., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Ślesak, H., & Szopa, A. (2020). Significance of *Artemisia vulgaris* L.(Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies. *Molecules*, 25(19), 4415.

- [4] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- [5] Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in plant science*, 14(3), 125-132.
- [6] Karabegović, I., Nikolova, M., Veličković, D., Stojičević, S., Veljković, V., & Lazić, M. (2011). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3), 504-511.
- [7] Kedare, S. B., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- [8] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118-126. doi: 10.4103/0973-7847.70902
- [9] Ly, B. T. K., Ly, D. M., Linh, P. H., Son, H. K., Le Ha, N., & Chi, H. T. (2020). Screening of medicinal herbs for cytotoxic activity to leukemia cells. *Journal of BU ON: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(4), 1989-1996.
- [10] Pandey, B. P., Thapa, R., & Upreti, A. (2017). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Artemisia vulgaris* and *Gaultheria fragrantissima* collected from Nepal. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(10), 952-959. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.005>
- [11] Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- [12] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- [13] Singh, V., Guizani, N., Essa, M. M., Rahman, M. S., & Selvaraju, S. (2012). In vitro antioxidant activities of *Ziziphus spina-christi* fruits (red date) grown in Oman. *Biotechnology*, 11(4), 209-216.
- [14] Wright, C. W. (2002). *Artemisia*, medicinal and aromatic plants-Industrial Profiles. *Chapter 1*, 10-22.