Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá và hàm lượng phenolic tổng trong cao chiết Cốt khí củ *Polygonum cuspidatum* polygonaceae

Huỳnh Thị Như Thuý

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
htnthuy@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Từ lâu, dược liệu Cốt khí củ đã được sử dụng chữa tê thấp, do bị ngã, bị thương, kinh nguyệt bế tắc; ngoài ra nó còn là một vị thuốc thu liễm, cầm máu. Hiện nay, một trong những hướng phát triển là chứng minh tác dụng của cao toàn phần, cao phân đoạn và hoạt chất tinh khiết của dược liệu bằng những mô hình thử nghiệm với các trang thiết bị hiện đại để có kết luận khoa học.

Do vậy, đề tài được thực hiện nhằm khảo sát tác dụng chống oxy hóa của cao toàn phần và các cao phân đoạn Cốt khí củ, từ đó xây dựng và thẩm định qui trình định lượng phenolic tổng của cao chiết có tác dụng chống oxy hóa. Kết quả đạt được: - Cao chiết cồn 70% từ Cốt khí củ có hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* tương đương 16,82% so với vitamin C. IC_{50} cao cồn 70% = 30,67µg/ml, IC_{50} vitamin C = 5,16µg/ml - Xây dựng qui trình định lượng polyphenol trong cao chiết Cốt khí củ bằng phương pháp quang phổ UV - Vis với thuốc thử Folin Ciocalteu. Qui trình đã được thẩm định: độ đặc hiệu, tính tuyến tính (ŷ = 0,0141x + 0,0267, R^2 = 1,00 với khoảng nồng độ khảo sát 10,0 – 60,0 (µg/ml), độ lặp lại (RSD = 2,7 %) và độ đúng (phục hồi 98,86%). Hàm lượng polyphenol P % trong cao chiết (qui về acid gallic): 10,09%.

Nhận 17.01.2019
Được duyệt 21.06.2019
Công bố 20.09.2019

Từ khóa
chống oxy hoá, phenolic, polyphenol, Cốt khí củ.

® 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Từ lâu, con người đã biết sử dụng cây cỏ trong thiên nhiên để chữa bệnh và truyền thống đó đã được duy trì – phát huy đến ngày nay, đặc biệt khi nước ta sở hữu một hệ động - thực vật phong phú, đa dạng. Trong số đó, cây Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. thuộc họ rau răm – Polygonaceae, đã được nền y học cổ truyền Việt Nam và Trung Quốc sử dụng lâu đời, dùng chữa tê thấp, bị thương, kinh nguyệt bế tắc, và còn là một vị thuốc thu liễm, cầm máu[1].

Có nhiều công trình khoa học công bố về hoạt tính sinh học của cao chiết Cốt khí củ trên in vitro và in vivo. Các hoạt tính sinh học như: chống oxy hóa, kích thích miễn dịch, chống ung thư, ức chế enzym tyrosinase, kháng khuẩn… Các nghiên cứu cũng đã chứng minh, các gốc tự do liên quan chặt chẽ với các bệnh xơ vữa mạch máu, bệnh gan, ung thư[2]

Do vậy, đề tài "Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá và hàm lượng phenolic tổng trong cao chiết Cốt khí củ *Polygonum cuspidatum* Polygonaceae" được thực hiện nhằm các mục tiêu cụ thể sau:

- Khảo sát dung môi chiết xuất hoạt chất từ dược liệu Cốt khí củ với định hướng tác dụng chống oxy hóa cao nhất.
- Khảo sát tác dụng chống oxy hóa của cao toàn phần và các cao phân đoạn.
- Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng phenolic tổng của cao chiết có tác dụng chống oxy hóa từ cây Cốt khí củ.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu là các cao toàn phần, cao phân đoạn và hợp chất polyphenol trong Cốt khí củ.
- Dược liệu Cốt khí củ *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. thuộc họ rau răm - Polygonaceae được thu hái tại Lào Cai tháng 6/2018.

Nguyên liệu được xay mịn qua rây 2mm, bảo quản trong lọ thủy tinh kín.

Độ ẩm: 9,2% được xác định theo hướng dẫn của PL.12.13 DĐVN IV.

- Chất đối chiếu: acid gallic, vitamin C (98%) do Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.HCM cung cấp

2.1.1 Dung môi - hoá chất - thuốc thử:

- Dung môi: ethanol, ethyl acetat, n-hexan, cloroform, methanol (Trung Quốc).

https://doi.org/10.55401/mv6xdw40

- Hoá chất, thuốc thử: natri carbonat, sắt (III) clorid (Trung Quốc), thuốc thử Folin-Ciocalteu, DPPH (Merck).

2.1.2 Trang thiết bị

− Bếp cách thuỷ Memmert

− Cân phân tích Sartorius PB 221S, độ nhạy 0,1 mg (Đức)

− Máy quang phổ UV - Vis Shimadzu 2550 (Japan)

− Máy siêu âm hiệu Elma (Đức)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết từ cây Cốt khí củ

Tiến hành: cân 50g bột dược liệu, chiết bằng phương pháp ngấm kiệt, lần lượt khảo sát với các dung môi cồn 96%, 70%, 50% và 25%. Dịch chiết được thu hồi dung môi đến cao đặc nhằm xác định dung môi thích hợp chiết xuất hoạt chất từ Cốt khí củ với định hướng cao chiết có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Sau đó, tách phân đoạn cao toàn phần và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa với thuốc thử DPPH

Mẫu thử: mẫu thử là các dịch chiết cùng nồng độ của các cao cồn 96%, 70%, 50%, 25% và các cao phân đoạn.

Chuẩn bị mẫu vitamin C

Pha các nồng độ 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25µg/ml trong methanol.

Thuốc thử DPPH (0,15mg/ml): hòa tan 15mg DPPH trong 100ml methanol, dung dịch được bảo quản ở 4°C, tránh ánh sáng. Thu được dung dịch có nồng độ 0,15mg/ml.

Phản ứng xác định hoạt tính chống oxy hóa: trong bình định mức 10ml, cho 2ml thuốc thử DPPH (0,15mg/ml), 1ml dung dịch thử nghiệm (các cao chiết từ Cốt khí củ), điền methanol đến vạch. Để yên 30 phút, tránh ánh sáng, tiến hành quét phổ trong vùng 400 – 800nm để tìm bước sóng cực đại.

Tỉ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH S%:

$$S\% = \frac{A_{chứng} - A_{thử}}{A_{chứng}} \times 100\%$$

Xác định IC_{50} của mẫu thử và vitamin C

Giá trị IC_{50} mẫu thử có nồng độ càng thấp, tác dụng loại bỏ gốc tự do càng mạnh, khả năng chống oxy hóa càng cao.

2.2.2 Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng polyphenol trong cao chiết từ Cốt khí củ

Chọn cao hoặc phân đoạn cao có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất và khảo sát qui trình định lượng polyphenol bằng phương pháp quang phổ với thuốc thử Folin–Ciocalteu

Khảo sát tỉ lệ thể tích dung dịch đối chiếu A với thuốc thử FC:

Trong bình định mức 10ml: cho lần lượt Xml (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 và 3,0) dung dịch đối chiếu A, cố định 1ml thuốc thử FC và 5ml dung dịch natri carbonat 20%. Lắc đều, xác định độ hấp thu tại bước sóng cực đại đã khảo sát.

Khảo sát tỉ lệ thể tích dung dịch chiết T với thuốc thử FC:

Trong bình định mức 10ml: cho lần lượt Xml (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 1,5 và 3,0) dung dịch thử T, cố định 1ml thuốc thử FC và 5ml dung dịch natri carbonat 20%. Lắc đều, xác định độ hấp thu tại bước sóng cực đại đã khảo sát.

Hàm lượng P% của polyphenol trong cao chiết Cốt khí củ tính theo công thức:

$$P\% = \frac{A_T \times m_C \times C\% \times D_T \times 100}{A_C \times m_T \times (100 - H)\% \times D_C \times 1000}$$

Thẩm định qui trình với các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

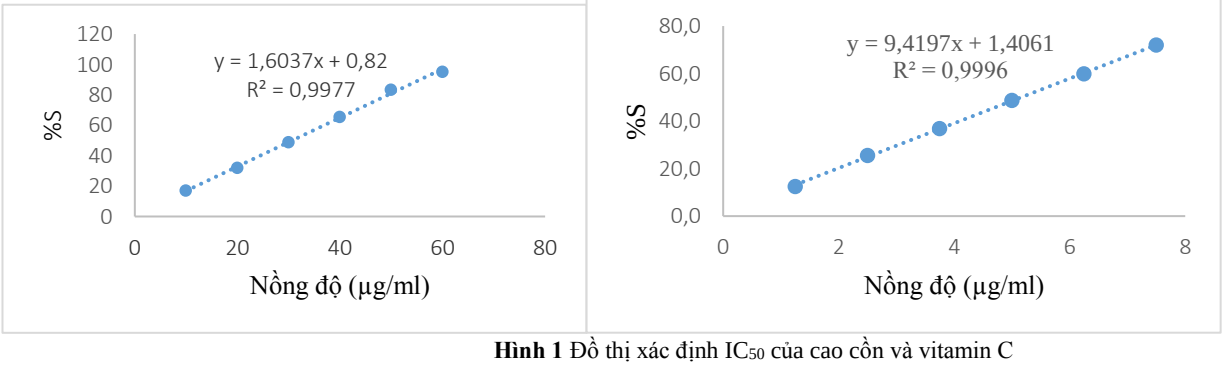
3 Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1 Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của các cao chiết

Bảng 1 Hoạt tính chống oxy hoá các mẫu cao chiết từ Cốt khí củ

Mẫu thử	% hoạt tính chống oxy hóa			
	Lần 1 (%)	Lần 2 (%)	Lần 3 (%)	TB (%)
Cao cồn 96%	78,9	77,9	78,2	78,3
Cao cồn 70%	**92,1**	**92,3**	**92,0**	**92,1**
Cao cồn 50%	90,3	90,1	90,2	90,2
Cao cồn 25%	88,1	88,4	88,5	88,3
Cao n – hexan	58,0	58,1	57,8	57,9
Cao cloroform	52,3	52,4	52,5	52,4
Cao etyl acetat	**80,0**	**80,2**	**80,3**	**80,1**

Cao cồn 70% toàn phần có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Từ kết quả này, tiến hành khảo sát IC_{50} của cao 70% và so sánh khả năng chống oxy hóa với vitamin C.



Hình 1 Đồ thị xác định IC_{50} của cao cồn và vitamin C

- Phương trình hồi qui của mẫu cao cồn 70%: y = 1,6037x + 0,82, R^2 = 0,9977

Từ đồ thị, xác định IC_{50} của cao cồn 70% là 30,67µg/ml.

- Phương trình hồi qui của vitamin C: y = 9,4197x + 1,461, R^2 = 0,9996

Từ đồ thị, xác định IC_{50} của vitamin C là 5,16µg/ml.

Kết quả trên chứng tỏ khả năng chống oxy hóa cao cồn 70% tương đương 16,82% so với vitamin C. Chọn cao này làm mẫu thử để định lượng hàm lượng polyphenol, bước đầu tiêu chuẩn hóa nguyên liệu cho các thử nghiệm sâu hơn về hóa học và sinh học của dược liệu Cốt khí củ.

3.2 Kết quả xây dựng qui trình định lượng polyphenol trong cao chiết Cốt khí củ

Xác định bước sóng hấp thu cực đại: cực đại hấp thu của dung dịch đối chiếu A là 761,8nm; dung dịch thử T là 761nm. Chọn bước sóng 761nm để tiến hành định lượng.

Xác định tỉ lệ thể tích dung dịch đối chiếu A, dịch chiết T với thuốc thử FC: 1ml thuốc thử FC đủ phản ứng với nồng độ 60µg/ml dung dịch đối chiếu A (tương đương 3ml); thời gian ổn định của mẫu trong 60 phút khảo sát.; 1ml thuốc thử FC đủ phản ứng với nồng độ 600µg/ml dung dịch thử T, thời gian ổn định trong 60 phút khảo sát.

Bảng 2 Kết quả khảo sát độ hấp thu khi thay đổi thể tích dung dịch thử T

Bình	Dung dịch thử T (ml)	A_{761}
1	0,5	0,0570
2	1,0	0,2396
3	1,5	0,3588
4	2,0	0,4492
5	3,0	0,6350

Bảng 3 Kết quả khảo sát độ ổn định của dung dịch thử T

Thời gian (phút)	**0'**	**5'**	**10'**	**15'**	**20'**	**25'**
Độ hấp thu A_{761}	0,2948	0,2947	0,2958	0,2935	0,3041	0,3032
Thời gian (phút)	**30'**	**35'**	**40'**	**45'**	**50'**	**60'**
Độ hấp thu A_{761}	0,3045	0,3056	0,3067	0,3057	0,3096	0,3022

Bảng 4 Khảo sát độ hấp thu dung dịch đối chiếu A với thuốc thử FC

Bình	Dung dịch A (ml)	A_{761}
1	0,5	0,1677
2	0,8	0,2523
3	1,0	0,3087
4	1,5	0,4497
5	2,0	0,5907
6	3,0	0,8727

Bảng 5 Khảo sát độ ổn định của dung dịch đối chiếu A với thuốc thử FC

Thời gian (phút)	**0'**	**5'**	**10'**	**15'**	**20'**	**25'**
Độ hấp thu A_{761}	0,3087	0,3078	0,3055	0,3077	0,3022	0,3045
Thời gian (phút)	**30'**	**35'**	**40'**	**45'**	**50'**	**60'**
Độ hấp thu A_{761}	0,3044	0,3066	0,3061	0,3042	0,3044	0,3012

Dự thảo qui trình định lượng polyphenol trong cao cồn 70%:

Sau các thử nghiệm khảo sát, qui trình xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao chiết Cốt khí củ được thực hiện theo bảng sau:

Bảng 6 Dự thảo qui trình định lượng polyphenol trong cao cồn 70%

Thành phần	Mẫu đối chiếu	Mẫu thử	Mẫu trắng
Dung dịch đối chiếu (ml)	1,0	0,0	0,0
Dung dịch thử (ml)	1,0	1,0	0,0
Thuốc thử FC (ml)	1,0	1,0	1,0
D.dịch Na_2CO_3 20 % (ml)	5,0	5,0	5,0
Nước cất vừa đủ (ml)	10		

Lắc đều, để yên các bình phản ứng trong 15 phút, xác định độ hấp thu tại bước sóng 761nm. Từ độ hấp thu của mẫu đối chiếu và mẫu thử, tính hàm lượng P (%) polyphenol trong cao chiết cồn 70% Cốt khí củ qui về acid gallic.

Mẫu đối chiếu: dung dịch acid gallic: 20µg/ml.

Hàm lượng P (%) polyphenol trong cao cồn 70% được tính theo công thức hoặc theo dữ liệu đường tuyến tính.

$$P\% = \frac{A_t x 10 x C\%}{A_c x m x (100 - H\%)}$$

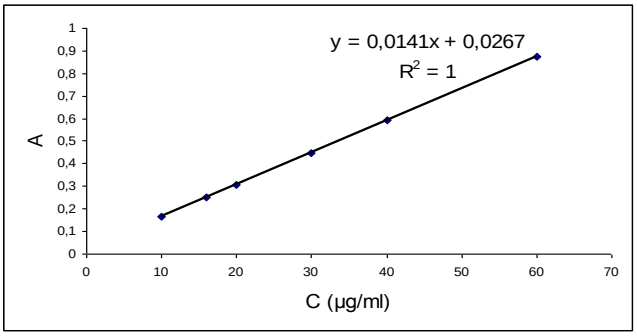
A_C: độ hấp thu của dung dịch chuẩn A

A_T: độ hấp thu của mẫu thử

m: khối lượng mẫu thử (g)

C%: độ tinh khiết acid gallic (98%)
H%: độ ẩm cao chiết (4,8%)
3.3 Kết quả thẩm định qui trình
Kết quả khảo sát độ đặc hiệu:
- Mẫu trắng không có tín hiệu tại bước sóng cực đại của mẫu đối chiếu và mẫu thử.
- Cực đại hấp thu của mẫu thử λ = 761nm tương đương với cực đại hấp thu của mẫu đối chiếu λ = 761,8nm.
- Khi thêm một lượng chất đối chiếu vào mẫu thử thì độ hấp thu của mẫu thử A_{761} = 0,3002 tăng lên A_{761} = 0,4160 so với trước khi thêm chất đối chiếu. Kết luận: qui trình đạt độ đặc hiệu.

Kết quả khảo sát tính tuyến tính:



Hình 2 Đồ thị biểu tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu

Nhận xét: có tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ A và nồng độ các dung dịch đối chiếu theo phương trình $\hat{y}$ = 0,0141x + 0,0267; R^2 = 1 (10,0 – 60,0µg/ml) theo Hình 2.

Kết quả khảo sát độ lặp lại: **Bảng 5** Kết quả độ lặp lại

Stt	m (g)	A_{761}	P (%)	
1	1,0123	0,3026	10,01	n = 6 X_{TB} = 9,97 % SD = 0,27 RSD = 2,7 %
2	1,0156	0,3079	10,15	
3	1,0086	0,2944	9,77	
4	1,0193	0,3062	10,06	
5	1,0032	0,2844	9,49	
6	1,0159	0,3136	10,33	

Nhận xét: qui trình đạt yêu độ lập lại khi RSD = 2,7% < 5% theo Bảng 5 [4]

Kết quả khảo sát độ đúng:

Bảng 6 Kết quả độ đúng

Mẫu	STT	$m_{cân}$(g)	Độ hấp thu	Nồng độ thêm vào (µg/ml)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm thấy (mg)	% phục hồi
80%	1	1,0026	0,5398	15,59	77,96	75,74	97,16
	2	1,0022	0,5465	15,59	77,96	77,77	99,75
	3	1,0054	0,553	15,59	77,96	80,07	102,71
Giá trị trung bình							99,87
100%	4	1,0088	0,6082	19,49	97,45	99,65	102,25
	5	1,0057	0,5962	19,49	97,45	95,39	97,89
	6	1,0023	0,5941	19,49	97,45	94,65	97,12
Giá trị trung bình							99,09
120%	7	1,0044	0,6627	23,39	116,94	118,97	101,74
	8	1,0032	0,6662	23,39	116,94	120,21	102,80
	9	1,0000	0,6481	23,39	116,94	113,79	97,31
Giá trị trung bình							100,62

Nhận xét: tỉ lệ phục hồi của qui trình là 99,86% trong khoảng (97 - 103%). Như vậy độ đúng đạt yêu cầu [5].

Bảng 7 Kết quả thẩm định qui trình

Chỉ tiêu	Kết quả
Độ Đặc Hiệu	Cực đại hấp thu mẫu thử tương đương mẫu đối chiếu: 761nm
Tính tuyến tính	Phương trình hồi qui ŷ = 0,0141x + 0,0267 Hệ số R^2 = 1 (khoảng nồng độ khảo sát 10,0 – 60,0µg/ml)
Độ lặp lại	Độ lệch chuẩn của hàm lượng poli phenol 2,7 %
Độ đúng	Tỉ lệ phục hồi của qui trình 98,86% (97 – 103%)
Kết luận	Qui trình đạt yêu cầu

4 Kết luận

- Cao chiết cồn 70% từ Cốt khí củ có hoạt tính chống oxy hóa in vitro tương đương 16,82% so với vitamin C.
IC_{50} cao cồn 70% = 30,67µg/ml, IC_{50} vitamin C = 5,16µg/ml
- Xây dựng qui trình định lượng poli phenol trong cao chiết Cốt khí củ bằng phương pháp quang phổ UV - Vis với thuốc thử Folin Ciocalteu. Qui trình đã được thẩm định: độ đặc hiệu, tính tuyến tính (ŷ = 0,0141x + 0,0267, R^2 = 1,00 với khoảng nồng độ khảo sát 10,0 – 60,0 (µg/ml), độ lặp lại (RSD = 2,7%) và độ đúng lệ (phục hồi 98,86%).
Hàm lượng polyphenol P% trong cao chiết (qui về acid gallic): 10,09%.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam*, Tập I, NXB Khoa học và Kĩ thuật Hà Nội, trang 529-531, 908-911, 971-976.
2. Chih-Chen Lee, Yen-Ting Chen, Chien-Chih Chiu, Wei-Ting Liao, Yung-Chuan Liu, and Hui-Min David Wang (2014), "*Polygonum cuspidatum* extracts as bioactive antioxidaion, anti-tyrosinase, immune stimulation and anticancer agents", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 1-6.
3. Nguyễn Thị Đỏ (2007), *Họ rau răm-Polygonaceae (trong thực vật chí Việt Nam, tập 11, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam),* NXB Khoa học Kĩ thuật, trang 142.
4. Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thư (2009), "Stress oxy hóa các chất chống oxy hóa tự nhiên", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, trang 667-677.
5. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), Validation of analytical procedures: text and methodology, pp. 1–13.

Survey of antioxidant activity and total phenolic content in polygonum cuspidatum polygonaceae

Huỳnh Thị Như Thuý

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
htnthuy@ntt.edu.vn

Abstract For ages, *Polygonum cuspidatum* Polygonaceae has been used to treat rheumatoid arthritis, bleeding from injuries. That is why amenorrhea is also a medicine to stop bleeding. Nowadays, one of the development directions is to demonstrate the effect of total extract, fractional and pure active ingredients of this medicinal material with experimental models by modern equipment for scientific research conclusions.
Therefore, we carried out the thesis "investigating antioxidant activity and total phenolic content of extract from *Polygonum cuspidatum* Polygonaceae " with the targets: - Survey of antioxidant effects of total extract and fractional - Building a process for quantifying the total phenolic content of total extract with antioxidant effect
Result:The 70% ethanol extraction's antioxidant is similar to 16,82% of ascorbic acid. IC_{50} value of 70% ethanol extraction is 30,67µg/ml. IC_{50} value of ascorbic acid is 5,16µg/ml.UV/Vis spectrophotometric method for analysis of total phenolic content . The process is tested: Specificity, Linearity (ŷ = 0,0141x + 0,0267, R^2 = 1,00 with concentrations around 10,0 – 60,0 (µg/ml)), Repeatability (RSD = 2,7%) and Accuracy (overall 98,86%). Polyphenol content (P%) in the extract (converted into gallic acid): 10,09%.

Keywords antioxidant, phenolic, polyphenol, *Polygonum cuspidatum*