



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.118

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT METHANOL CÂY LƯỠI RẮN TRẮNG (*Hedyotis diffusa* willd.)

Phan Kim Định¹, Võ Thị Mỹ Huyền², Trịnh Dương Hạnh My³, Lê Thị Điềm⁴, Trần Chí Linh¹, Nguyễn Trọng Tuấn¹ và Đái Thị Xuân Trang^{1*}

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Công ty cổ phần thương mại dịch vụ Cổng Vàng (Golden Gate Restaurant Group)

³Công ty cổ phần Tập đoàn Mặt Trời (Sun Group)

⁴Viện Di truyền Y học (Medical Genetics Institute)

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đái Thị Xuân Trang (email: dtxtrang@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The study is aimed at evaluating some biological activities of methanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae family). The chemical composition of *Hedyotis diffusa* Willd. contained alkaloids, flavonoids, glycosides, tannins and triterpenoids. The total polyphenol and flavonoid contents were equivalent to 83.58 ± 1.38 mg GAE/g and 398.53 ± 7.13 mg QE/g, respectively. The results from 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and reducing power (RP) assays showed slightly high antioxidant activity of the extracts from *H. diffusa*. The anti-inflammatory activity was determined by two in vitro methods: inhibition of heat induced denaturation of egg albumin and Bovine serum albumin. The results have shown that the percentage inhibition was observed at 200 μ g/mL ($57.07 \pm 5.93\%$) for egg albumin and ($60.30 \pm 6.04\%$) for bovine serum albumin. The hepatoprotective activity of the extract was investigated in mice which were previously treated with carbon tetrachloride (CCl₄) to induce liver damage. The extract at the dose of 100, 200 and 400 mg/kg body weight effectively reduced the level of alanine transaminase and aspartate transaminase in serum. In addition, the extract also improved the oxidative stress status in mice liver through effective reduction of malondialdehyde level and increasing of glutathione level in the liver.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định một số hoạt tính sinh học của cây Lưỡi rắn trắng *Hedyotis diffusa* Willd. (họ Cà phê). Cao chiết Lưỡi rắn trắng được xác định có chứa alkaloid, flavonoid, glycoside, tannin và triterpenoid. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng lần lượt tương đương $83,58 \pm 1,38$ mg GAE/g cao chiết và $398,53 \pm 7,13$ mg QE/g cao chiết. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH và khử sắt cho thấy cao chiết Lưỡi rắn trắng có hoạt tính chống oxy hóa khá cao. Cao chiết Lưỡi rắn trắng được khảo sát hoạt tính chống viêm bằng phương pháp ức chế sự biến tính protein huyết thanh bò và albumin trứng. Kết quả cho thấy rằng, cao chiết Lưỡi rắn trắng ở nồng độ 200 μ g/mL có khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò đạt $60,30 \pm 6,04\%$ và ức chế sự biến tính albumin trứng đạt $57,07 \pm 5,93\%$. Kết quả khảo sát hiệu quả bảo vệ gan trên mô hình chuột được gây tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl₄) của cao chiết Lưỡi rắn trắng cho thấy, ở cả 3 liều cao chiết khảo sát (100, 200, 400 mg/kg khối lượng chuột) đều có khả năng làm giảm trên 50% hàm lượng enzyme AST và ALT. Bên cạnh đó, cao chiết Lưỡi rắn trắng cũng cải thiện tình trạng stress oxy hóa trong gan chuột thí nghiệm qua hiệu quả làm giảm mức malondialdehyde và tăng mức glutathione trong mô gan.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2020

Ngày nhận bài sửa: 09/05/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Study on some biological activities of methanol extract of *Hedyotis diffusa* Willd

Từ khóa:

Bảo vệ gan, carbon tetrachloride, chống oxy hóa, chống viêm, *Hedyotis diffusa* Willd.

Keywords:

Anti-inflammatory, antioxidant, carbon tetrachloride, *Hedyotis diffusa* Willd., hepatoprotection

Trích dẫn: Phan Kim Định, Võ Thị Mỹ Huyền, Trịnh Dương Hạnh My, Lê Thị Điềm, Trần Chí Linh, Nguyễn Trọng Tuấn và Đái Thị Xuân Trang, 2020. Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của cao chiết methanol cây lưỡi rắn trắng (*Hedyotis diffusa* Willd.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên)(2): 103-114.

1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, trên thế giới có các loại thuốc tổng hợp sử dụng tiện lợi và hiệu quả cao trong việc chữa bệnh, tuy nhiên nhiều người vẫn thích sử dụng các loại thuốc dân gian truyền thống vì ít gây tác dụng phụ và dễ sử dụng với giá cả hợp lý (Kumaresan *et al.*, 2019). Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), khoảng 65- 80% dân số sống ở các nước đang phát triển dựa vào thực vật để chăm sóc sức khỏe cơ bản (Johnson and Ayooola, 2015) và khoảng 25% loại thuốc thông dụng có nguồn gốc từ thực vật (Calixto, 2019). Thực vật thuốc được quan tâm nhiều vì tiềm năng chống oxy hóa của chúng (Nandhakumar and Indumathi, 2013). Các nghiên cứu đã phát hiện hoạt động chống oxy hóa của một số thực vật chủ yếu là nhờ vào các hợp chất phenolic như flavonoid, phenolic acid, các carotenoid, vitamin C và vitamin E (Sawadogo *et al.*, 2006; Traber and Stevens, 2011). Chất chống oxy hóa thực vật rất hiệu quả trong việc ngăn chặn sự tổn thương hệ thống sinh lý gây ra bởi sự sản xuất quá mức các gốc tự do dẫn đến stress oxy hóa (Gruz *et al.*, 2011). Các chất ô nhiễm môi trường, phóng xạ, hóa chất, độc tố, thực phẩm chiên rán và thực phẩm cay, cũng như căng thẳng về thể chất là những nguyên nhân tạo ra các gốc tự do ROS (reactive oxygen species), gây ra sự hình thành các protein bất thường dẫn đến suy giảm chất chống oxy hóa trong hệ thống miễn dịch (Agrawal *et al.*, 2011), đồng thời gây stress oxy hóa trong gan có thể dẫn đến viêm và thoái hóa gan. Tổn thương gan kéo dài có thể gây ra các bệnh về gan mãn tính (Chatterjee and Mitra, 2015; Li *et al.*, 2015). Stress oxy hóa trên gan ảnh hưởng đến các chất chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GSH) và tăng sự peroxide hóa lipid (LPO) trong gan (Banu *et al.*, 2012; Habib *et al.*, 2015). Sử dụng chất chống oxy hóa ngoại sinh là một cách hợp lý để phòng ngừa và điều trị các bệnh về gan có liên quan đến stress oxy hóa (Medina and Moreno-Otero, 2005). Chất chống oxy hóa tự nhiên chứa trong các thực vật làm thức ăn hoặc làm thuốc thường có khả năng chống oxy hóa và làm sạch gốc tự do mạnh cũng như tác dụng chống viêm được coi là cơ sở của các hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe (Li *et al.*, 2015). Việc nghiên cứu phát hiện các loài thực vật có các hoạt tính sinh học tiềm năng như chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ gan là cần thiết.

Cây Lưỡi rắn trắng (LRT) (*Hedyotis diffusa* Willd.) thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) là loại cây thân thảo hàng năm, mọc hoang ở nhiều nơi, phân bố rộng rãi ở một số nơi trên thế giới như: Trung quốc,

Nhật Bản, Việt Nam và Indonesia. Theo Chen *et al.* (2016), cây LRT có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng bao gồm 32 iridoid, 26 flavonoid, 24 anthraquinone, 26 phenolic và các dẫn xuất của chúng, 50 tinh dầu bay hơi và 13 hợp chất khác. Cây LRT đã được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa, có tác dụng chống viêm, điều hòa miễn dịch, có hiệu quả chống nhiều loại ung thư. Theo Phạm Hoàng Hộ (2003), cây LRT ở Việt nam thường được dùng trong việc điều trị các bệnh về gan, bệnh lậu, ung thư, sốt, máu xấu, thiếu mật, các bệnh về dạ dày và u hạch nhưng chưa được nghiên cứu chứng minh.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện, thiết bị và vật liệu thí nghiệm

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm máy cô quay chân không (Heidolph, Đức), máy đo quang phổ (Beckman Coulter 640B, Mỹ) và các thiết bị khác.

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm albumin huyết thanh bò (BSA) (Himedia), lòng trắng trứng gà, silymarin (Sigma–Aldrich), methanol (Trung Quốc), glutathione (Đài Loan), CCl₄ (Merck) và một số hóa chất khác.

Vật liệu thí nghiệm là cây Lưỡi rắn trắng (*Hedyotis diffusa* Willd.) được thu hái tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long trong thời kỳ cây đang ra hoa được định danh dựa vào hình thái cơ quan theo mô tả trong bộ sách cây Cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ (2003) dưới sự hỗ trợ bởi ThS. Phùng Thị Hằng thuộc Bộ môn Sư phạm Sinh học, Khoa Sư Phạm. Mẫu được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Đối tượng thí nghiệm là Chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var Albino) khỏe mạnh chọn ngẫu nhiên cả đực và cái, trọng lượng từ 20-25 gram do Viện Pasteur-Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp, được nuôi ở phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại Học Cần Thơ ở nhiệt độ phòng và chu kỳ sáng tối 12/12 giờ.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Điều chế cao chiết

Cây LRT sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi sấy khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm dầm trong methanol. Mẫu được ngâm 5 lần, mỗi lần

ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay tách dung môi thu được cao methanol tổng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

2.2.2 Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần

Định lượng polyphenol tổng bằng thuốc thử Folin–Ciocalteu

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton *et al.* (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μ L cao methanol trong 250 μ L nước và 250 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 μ L Na_2CO_3 10% rồi ủ 30 phút ở 40°C trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Gallic acid (2 - 10 μ g/mL) được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol tổng trong cao chiết Lưỡi Rắn Trắng được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid.

Phương pháp định lượng flavonoid

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu AlCl_3 của Bag *et al.* (2015) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL cao chiết ở nồng độ khảo sát pha trong 1 mL nước cất rồi lắc đều. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được thêm vào 200 μ L NaNO_2 5%. Để yên 5 phút tiếp tục thêm 200 μ L AlCl_3 10%, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút được thêm 2 mL NaOH 1 M. Cuối cùng hỗn hợp phản ứng được thêm nước cho đủ 5 mL. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin (20-120 μ g/mL) được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao chiết được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.3 Phương pháp khảo sát khả năng chống oxy hóa

Khảo sát khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH

Khả năng chống oxy hóa của cao chiết LRT được xác định bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH theo Prakash *et al.* (2000) có hiệu chỉnh được tóm tắt như sau: Hỗn hợp phản ứng gồm 200 μ L DPPH (6×10^{-4} M) và 200 μ L cao chiết LRT ở nồng độ từ 50 đến 500 μ g/mL. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định dựa vào giá trị SC_{50} (scavenging capacity of 50%) và giá trị SC_{50}

được tính dựa trên phương trình tuyến tính của dịch chiết khảo sát. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C ở các nồng độ khảo sát từ 4 đến 40 μ g/mL.

Khảo sát khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt (reducing power)

Khả năng khử sắt của cao chiết và BHA được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu (1986): Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 0,5 mL cao chiết LRT ở các nồng độ khảo sát từ 100 đến 1000 μ g/mL, 0,5 mL đệm phosphate 0,2 M pH 6,6 và 0,5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 0,5 mL CCl_3COOH 10% và ly tâm 3000 vòng/ phút trong 10 phút. Phần dịch ly tâm được rút 0,5 mL cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL FeCl_3 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định dựa vào giá trị SC_{50} (scavenging capacity of 50%). Butylated hydroxyanisole (BHA) được sử dụng như chất đối chứng dương và được khảo sát ở các nồng độ từ 0 đến 100 μ g/mL.

2.2.4 Khảo sát khả năng chống viêm in vitro

Khảo sát khả năng ức chế sự biến tính protein albumin huyết thanh bò (BSA)

Khả năng chống viêm của cao chiết LRT được khảo sát thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein được thực hiện theo phương pháp của Shah *et al.* (2017) có hiệu chỉnh. Dung dịch thử 1 mL (ở các nồng độ: 0; 50; 100 và 200 μ g/mL) được trộn với 1 mL dung dịch BSA 5%. Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 27°C trong 15 phút. Sự biến tính protein được tạo ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 10 phút. Sau khi làm mát, tiến hành đo mật độ quang tại bước sóng 660 nm. Thuốc chống viêm diclofenac được sử dụng như chất chống viêm tiêu chuẩn. Khả năng ức chế sự biến tính protein của cao chiết LRT được xác định theo công thức sau: % Ức chế = $100 \times (1 - \text{Vt}/\text{Vc})$. Trong đó, Vt: mật độ quang của mẫu thử có chứa cao chiết hoặc thuốc chuẩn, Vc: mật độ quang của mẫu chứa đệm phosphate. Xây dựng đường chuẩn với phần trăm ức chế sự biến tính BSA thu được ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính giá trị IC_{50} (nồng độ cao chiết hay diclofenac mà tại đó ức chế 50% sự biến tính BSA) dựa vào phương trình đường chuẩn $y = ax + b$.

Khảo sát khả năng ức chế sự biến tính protein albumin trứng

Hoạt tính chống viêm của cao chiết chống lại sự biến tính protein bằng cách sử dụng albumin trứng

theo Prakash *et al.* (2013). Hỗn hợp phản ứng gồm 0,1 mL albumin trứng, 1,4 mL đệm phosphate (pH=6,4) và 1 mL cao chiết (ở các nồng độ: 0; 50; 100 và 200 µg/mL). Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 15 phút. Sự biến tính protein được gây ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 70°C trong 5 phút. Sau khi làm mát, tiến hành đo mật độ quang tại bước sóng 660 nm.

Thuốc chống viêm diclofenac được sử dụng như chất chống viêm tiêu chuẩn. Khả năng ức chế sự biến tính protein của cao chiết LRT được xác định theo công thức sau: % Ức chế = 100 (1-Vt/Vc). Trong đó, Vt: mật độ quang của mẫu thử, Vc: mật độ quang của mẫu đối chứng không có cao chiết. Xây dựng đường chuẩn với phần trăm ức chế sự biến tính protein albumin trứng thu được ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính giá trị IC₅₀ (nồng độ cao chiết hay diclofenac mà tại đó ức chế 50% sự biến tính protein albumin trứng) dựa vào phương trình đường chuẩn $y = ax + b$.

2.2.5 Khảo sát hoạt tính bảo vệ gan

Thí nghiệm khảo sát hoạt tính bảo vệ gan được thực hiện theo Kang and Koppula (2014) có hiệu chỉnh. Chuột được gây tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl₄) liều 2,5 mL/kg khối lượng chuột (CCl₄ trong dầu olive theo tỉ lệ 1:4). Chuột tổn thương gan được điều trị bằng cao chiết ở liều 100, 200 hoặc 400 mg/kg khối lượng chuột; tinh chất silymarin liều 16 mg/kg khối lượng chuột được sử dụng như đối chứng dương. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% dùng để pha cao chiết và silymarin. Sau 1 giờ chuột uống CCl₄ được uống cao chiết hoặc silymarin với liều tương ứng liều điều trị mô tả ở trên/lần × 1 lần/ngày. Chuột khỏe mạnh được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột.

Các nhóm chuột thí nghiệm được bố trí như sau: chuột bình thường (đối chứng sinh lý); chuột uống DMSO 1%; chuột uống CCl₄ không điều trị (đối chứng bệnh); chuột uống CCl₄ điều trị bằng silymarin liều 16 mg/kg khối lượng (đối chứng dương); chuột uống CCl₄ điều trị bằng cao chiết LRT liều 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg khối lượng. Thí nghiệm được tiến hành trong 4 tuần, kết thúc thí nghiệm chuột được cân khối lượng, gây mê và giải phẫu lấy máu ở tim để xét nghiệm sinh hóa (alanine transaminase, aspartate transaminase), gan được tách lấy rửa qua dung dịch sinh lý để phân tích sinh hóa (malondialdehyde, glutathione)

Khả năng bảo vệ gan của cao chiết được đánh giá bằng việc xác định hoạt độ của enzyme alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST)

trong huyết thanh và hàm lượng malondialdehyde (MDA) và glutathione (GSH) trong gan của chuột thí nghiệm. Máu chuột thí nghiệm được đo hoạt độ enzyme ALT và AST bằng máy xét nghiệm sinh hóa bán tự động Erba CHEM-7. Đồng thời, gan chuột được xử lý và tiến hành định lượng MDA và GSH theo phương pháp của Ohkawa *et al.* (1979) và Moron *et al.* (1979) có hiệu chỉnh. Gan chuột được tách ra khỏi cơ thể và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm KCl 1,15% ở nhiệt độ 4°C. Dịch đồng thể gan gồm 1 mL được trộn với 0,5 mL dung dịch đệm phosphate 25 mM (pH = 7,4) và ủ ở 37°C trong 60 phút. Phản ứng sau khi được kết thúc bằng 0,5 mL tricloacetic acid 10% được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch lỏng sau khi ly tâm được sử dụng để xác định hàm lượng MDA và GSH.

Hàm lượng MDA được xác định như sau: Lấy 1 mL dịch ly tâm cho phản ứng với 0,5 mL thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 30 phút và đo mật độ quang ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng MDA (nM MDA/g mô) được tính dựa theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA.

Hàm lượng GSH được xác định như sau: 1 mL dịch ly tâm được phản ứng với 0,2 mL thuốc thử Ellman và 1,8 mL dung dịch đệm EDTA phosphate. Hỗn hợp phản ứng được để yên 3 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 412 nm. Hàm lượng GSH (nM GSH/g mô) được tính dựa theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn GSH.

2.2.6 Thống kê phân tích số liệu

Số liệu được trình bày bằng MEAN±SEM và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 (ANOVA-Fisher's). Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết LRT

Bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên theo Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), cao chiết LRT được xác định có chứa một số nhóm hợp chất như alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin, tannin và đường khử. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) với chất chuẩn là gallic acid trong khoảng nồng độ từ 2 đến 10 µg/mL có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,083x + 0,112$ (R² = 0,98). Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) với chất chuẩn quercetin trong dãy nồng độ từ 20 đến 120 µg/mL với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,005x - 0,009$ (R² = 0,99). Trên cơ sở các đường chuẩn này, cây LRT có hàm lượng polyphenol tổng

là 83,58±1,38 mg GAE/g cao chiết và hàm lượng flavonoid toàn phần là 398,53±7,13 mg QE/g cao chiết. Polyphenol là chất chống oxy hóa tự nhiên trong trái cây, rau quả và các loại đồ uống có nguồn gốc từ thực vật như trà và rượu, đã được chứng minh có nhiều đặc tính có lợi (Havsteen, 2002). Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết LRT cao hơn một số cây khác như lá cây Húng quế (*Oscimum basilicum*) (9,0±0,7 mg GAE/g), rễ cây Thiên thảo (*Rubia cordifolia*) (9,6±0,9 mg GAE/g), cây Ngò om (*Limnophila aromatica*) (31,5±1,6 mg GAE/g) (Jain *et al.*, 2011; Do *et al.*, 2014). Flavonoid là chất chống oxy hóa tốt, có khả năng bảo vệ chống các tổn thương do sự oxy hóa gây ra bởi các gốc tự do, chống lại bệnh tật (Panche *et al.*, 2016). Hàm lượng flavonoid toàn phần của cao chiết LRT cao hơn một số cao chiết khác như Bướm bạc (*Mussaenda afzeli*) (3,7±0,1 mg QE/g) (Agbo *et al.*, 2015), Cà gai leo

(*Solanum hainanese* Hance) (35,2±0,6 mg QE/g) (Nguyen and Eun, 2011).

3.2 Kết quả chống oxy hóa của cao chiết LRT

Khả năng chống oxy hóa theo phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH

Khả năng chống oxy hóa của cao chiết LRT được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH được trình bày ở Bảng 1. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tỉ lệ thuận với nồng độ cao chiết, hiệu suất trung hòa cao khi nồng độ cao chiết lớn và ngược lại. Hiệu suất trung hòa gốc tự do cao nhất là 58,76±0,73% ở nồng độ 500 µg/mL và thấp nhất là 4,07±0,29% ở nồng độ 50 µg/mL. Ngoài ra, cao chiết có nồng độ từ 0 đến 500 µg/mL có lượng chất chống oxy hóa tương đương vitamin C tương ứng tăng dần từ 0 đến 62,37±0,79 µg/mL.

Bảng 1: Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH của cao chiết Lưỡi Rắn Trắng

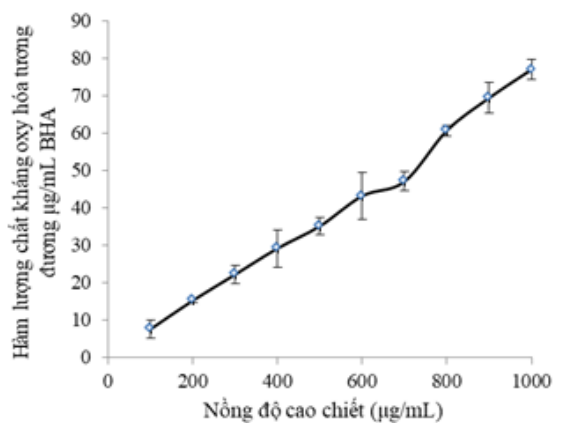
Nồng độ cao chiết(µg/mL)	Hiệu suất trung hòa gốc tự do (%)	Hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương µg/mL Vitamin C
0	0	0
50	4,07±0,29	11,26±0,19
100	8,31±0,99	15,23±0,66
150	11,46 ^h ±0,26	18,17 ^h ±0,12
200	17,73 ^g ±0,45	24,03 ^g ±0,66
250	22,45 ^f ±0,44	28,44 ^f ±0,52
300	25,88 ^e ±0,91	31,65 ^e ±0,70
350	34,12 ^d ±0,25	39,35 ^d ±0,42
400	40,84 ^c ±1,02	45,63 ^c ±1,08
450	48,25 ^b ±0,29	52,56 ^b ±0,74
500	58,75 ^a ±0,73	62,37 ^a ±0,79

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (p<0,05).

Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cao chiết còn được xác định dựa vào giá trị SC₅₀ (scavenging capacity of 50%), khả năng trung hòa 50% gốc tự do) được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính và so sánh với chất chuẩn vitamin C. Giá trị SC₅₀ của cao chiết là 473,83±26,99 µg/mL (y = 0,113x - 3,54 (R² = 0,97)) và SC₅₀ của vitamin C là 46,52±0,68 µg/mL (y = 0,984x + 4,20 (R²=0,98)). Kết quả cho thấy, cao chiết có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH thấp hơn vitamin C khoảng 10 lần.

Khả năng chống oxy hóa của cao chiết LRT dựa trên khả năng khử sắt

Hiệu quả chống oxy hóa của cao chiết LRT dựa trên khả năng khử sắt được tính tương đương µg/mL BHA dựa vào phương trình đường chuẩn BHA: y = 0,011x + 0,144 (R² = 0,993). Kết quả được trình bày trong Hình 1.



Hình 1: Hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương BHA của cao chiết LRT

Hình 1 cho thấy hàm lượng chất chống oxy hóa trong cao LRT tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA (khả năng khử sắt) tỉ lệ thuận với nồng độ cao chiết, hàm lượng chất chống oxy hóa trong cao LRT tương đương $\mu\text{g/mL}$ BHA tăng từ $7,67 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ lên $76,96 \pm 2,73 \mu\text{g/mL}$ ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả phân tích cũng cho thấy hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương $\mu\text{g/mL}$ theo các nồng độ cao khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Hiệu quả chống oxy hóa của cao chiết LRT theo phương pháp khử sắt được so sánh với chất chuẩn BHA bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết ($\mu\text{g/mL}$) có giá trị SC_{50} . Dựa vào phương trình đường chuẩn BHA và LRT, giá trị SC_{50} của BHA và cao chiết LRT lần lượt được xác định là $30,19 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ và $401,40 \pm 23,38 \mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của cao chiết LRT thấp hơn BHA là 17,5 lần. Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết LRT ($SC_{50} = 473,83 \pm 26,99 \mu\text{g/mL}$) tương đương với cao chiết hoa Nhài (*Jasminum multiflorum*) ($SC_{50} = 437,83 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$) (Kumaresan *et al.*,

2019) nhưng cao hơn Mơ tròn (*Paederia foetida*) ($SC_{50} = 740,60 \pm 36,58 \mu\text{g/mL}$) (Ojha *et al.*, 2018). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết LRT sở hữu khả năng kháng oxy hóa chính là nhờ vào sự hiện diện của các hợp chất tự nhiên, mà chủ yếu là polyphenol và flavonoid đã được xác định ở trên. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid có hoạt tính sinh học cao, đặc biệt là khả năng chống oxy hóa. Khả năng oxy hóa cho phép các hợp chất polyphenol hoạt động như một chất khử cung cấp hydro và làm ngừng hoạt động của các gốc oxy tự do (Chang *et al.*, 2001). Flavonoid là một nhóm các hợp chất có trong thực vật, cho thấy hoạt tính kháng oxy hoá thông qua quá trình thu nhận hoặc khử gốc tự do (Baharfar *et al.*, 2015).

3.3 Kết quả chống viêm *in vitro*

Hoạt tính chống viêm của cao chiết LRT được khảo sát dựa trên hoạt động ức chế sự biến tính protein albumin huyết thanh bò (BSA) và albumin trứng. Kết quả khả năng ức chế sự biến tính protein của cao chiết LRT được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Hiệu suất ức chế sự biến tính protein của cao chiết LRT

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Hiệu suất ức chế sự biến tính protein (%)	
	Albumin huyết thanh bò	Albumin trứng
0	-	-
50	$42,03^c \pm 2,8$	$45,40^c \pm 1,61$
100	$51,28^b \pm 2,43$	$48,25^b \pm 2,72$
200	$60,30^a \pm 6,04$	$57,07^a \pm 5,93$

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$), "-" không xác định

Dựa vào kết quả trình bày trong Bảng 2, cao chiết LRT có hiệu suất ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò tăng từ $42,03 \pm 2,8\%$ ở nồng độ cao chiết 50 $\mu\text{g/mL}$, ở nồng độ cao chiết 100 $\mu\text{g/mL}$, hiệu suất ức chế đạt $51,28 \pm 2,43\%$ và khi tăng nồng độ cao chiết lên 200 $\mu\text{g/mL}$ thì hiệu suất ức chế đạt $60,30 \pm 6,04\%$. Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho thấy hiệu suất ức chế sự biến tính albumin trứng của cao chiết LRT cũng tăng dần theo nồng độ cao chiết, trong khoảng nồng độ từ 50 đến 200 $\mu\text{g/mL}$ hiệu suất ức chế tăng từ $45,40 \pm 1,61\%$ đến $57,07 \pm 5,93\%$.

Khả năng chống viêm của cao chiết LRT được so sánh với chất chuẩn diclofenac dựa vào nồng độ cao chiết hoặc chất chuẩn ức chế được 50% sự biến tính protein (IC_{50} -the half maximal inhibitory concentration). Giá trị IC_{50} thấp, khả năng ức chế sự biến tính protein cao hay hoạt tính chống viêm của mẫu thử mạnh. Đối với protein huyết thanh bò, giá trị IC_{50} của cao chiết LRT và diclofenac lần lượt là

$105,67 \pm 2,56 \mu\text{g/mL}$ và $0,56 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$; đối với protein albumin lòng trắng trứng có giá trị IC_{50} của cao chiết LRT và diclofenac lần lượt là $120,73 \pm 4,51 \mu\text{g/mL}$ và $41,60 \pm 3,94 \mu\text{g/mL}$. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết LRT có khả năng ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò thấp hơn diclofenac khoảng 193 lần và khả năng ức chế sự biến tính albumin trứng thấp hơn diclofenac khoảng 3 lần. Kết quả cho thấy, cao chiết LRT có khả năng ức chế sự biến tính protein (khả năng chống viêm) tốt hơn so với một số cao chiết khác, ở cùng nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ hiệu suất ức chế sự biến tính albumin trứng của cao chiết hạt Điều (*Anacardium occidentale*) đạt $45,09 \pm 2,55\%$ (Rajeswaramma and Jayasree, 2018), cao chiết củ Nghệ đen (*Curcuma zedoaria*) đạt $36,78\%$ (Ullah *et al.*, 2014). Ở nồng độ 250 $\mu\text{g/mL}$ cao chiết lá Thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) ức chế sự biến tính albumin huyết thanh bò đạt $42,8\%$ (Shravan *et al.*, 2011). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh có sự tương quan giữa

hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính chống viêm và hàm lượng polyphenol chứa trong cao chiết. Các cao chiết có khả năng chống oxy hóa có hàm lượng polyphenol càng cao thì khả năng chống viêm càng mạnh. Các chất chống oxy hóa tự nhiên trong dược liệu là những chất chống viêm tiềm năng đã và đang thu hút sự chú ý trong những năm gần đây (Moreno-Quirós *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

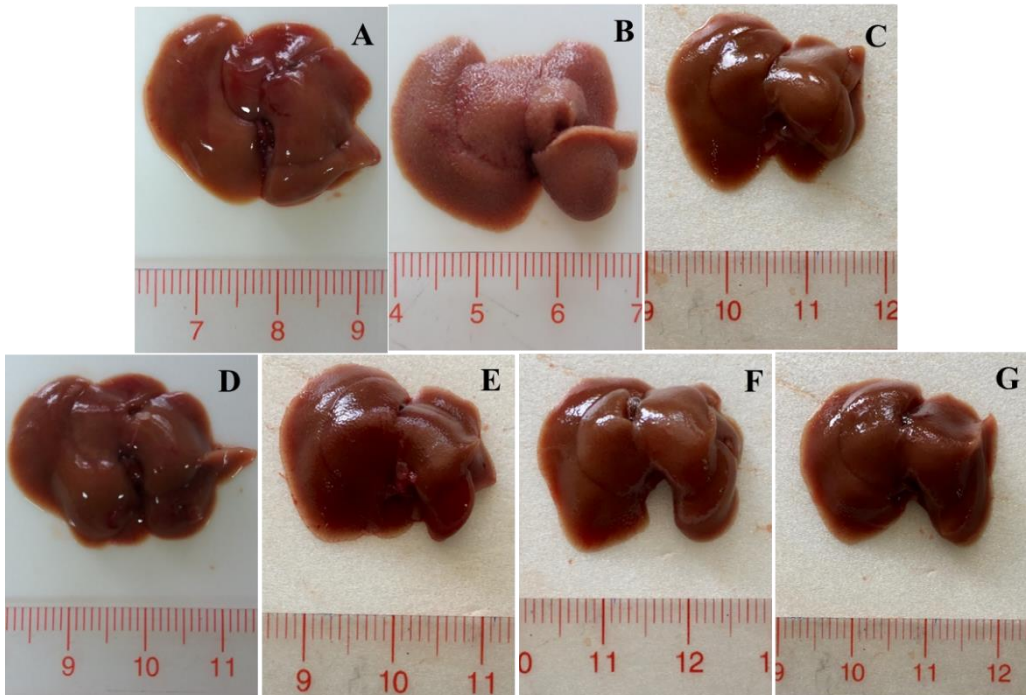
3.4 Hiệu quả bảo vệ gan của cao chiết LRT

Hình thái gan chuột sau thí nghiệm

Trong nghiên cứu bảo vệ gan theo mô hình thí nghiệm trên động vật, việc quan sát hình thái bên ngoài của gan động vật thí nghiệm là bước đầu để nhận biết khả năng bảo vệ gan của thuốc hoặc mẫu thử. Quan sát hình thái gan ở các nhóm chuột đối chứng (Hình 2) có sự khác biệt rất rõ. Gan của nhóm chuột bình thường (nhóm đối chứng sinh lý) (Hình 2A) có bề mặt trơn láng, mềm, mịn và có màu đỏ sậm. Trong khi đó, ở nhóm chuột uống carbon tetrachloride (CCl_4) (nhóm đối chứng bệnh) gan đã bị tổn thương (Hình 2B), kích thước gan lớn do tế bào gan phình to, bề mặt gan gồ ghề, xơ dai. Các vùng trên gan có màu sắc không đồng nhất, phần lớn bị tái nhợt và đôi khi trên bề mặt xuất hiện các đốm

bất thường. Nhóm chuột uống DMSO 1% (Hình 2C) có gan tương tự nhóm bình thường. Đối với nhóm chuột cho uống CCl_4 được điều trị bằng silymarin (Hình 2D), gan chuột có nhiều cải thiện về mặt hình thái. Bề mặt gan chuột điều trị bằng silymarin vẫn chưa bóng mịn như gan nhóm chuột bình thường nhưng so với nhóm đối chứng bệnh, mức độ tổn thương đã giảm rõ.

Ở nhóm chuột gây bệnh bằng CCl_4 uống thêm cao chiết LRT, gan chuột được cải thiện đáng kể so với nhóm chuột đối chứng bệnh. Gan của nhóm chuột gây bệnh được điều trị bằng cao chiết LRT (Hình 2E, 2F, 2G) so với nhóm chuột bình thường (Hình 2A) khác biệt không nhiều. Màu sắc gan ở nhóm chuột uống cao chiết LRT nồng độ 100 mg/kg (Hình 2E) và 200 mg/kg (Hình 2F) tuy còn nhạt hơn nhóm bình thường, nhưng sang nồng độ 400 mg/kg (Hình 2G), màu sắc gan rất giống với nhóm chuột bình thường. Đặc biệt ở nồng độ 400 mg/kg, không chỉ màu sắc mà kể cả độ láng và các đặc điểm hình thái rất giống với nhóm chuột bình thường. Kết quả hình thái bên ngoài của gan ở nhóm chuột thí nghiệm cho thấy được khả năng bảo vệ gan của cao chiết LRT.



Hình 2: Hình thái bên ngoài của gan ở các nhóm chuột thí nghiệm

A. chuột bình thường; B. chuột uống CCl_4 ; C. chuột uống DMSO 1%; D. chuột uống CCl_4 , silymarin; E. chuột uống CCl_4 , LRT 100 mg/kg; F. chuột uống CCl_4 , LRT 200 mg/kg; G. CCl_4 , LRT 400 mg/kg.

Hàm lượng các enzyme transaminase trong máu, MDA và GSH trong gan chuột sau thí nghiệm

Carbon tetrachloride (CCl₄) được biết là tác nhân gây độc gan và đặc trưng của sự nhiễm độc gan do CCl₄ là gan nhiễm mỡ, xơ gan và hoại tử (Huo *et al.*, 2011). Do đó, mô hình gây nhiễm độc gan bằng CCl₄ được sử dụng như mô hình thử nghiệm gây tổn thương gan để sàng lọc các loại cao chiết hoặc thuốc bảo vệ gan (Refaey *et al.*, 2015). CCl₄ được chuyển hóa bởi cytochrome P-450 và chuyển đổi thành trichlorometyl và gốc peroxy trichloromethyl, các gốc tự do này liên kết với protein và lipid màng gây peroxid hóa lipid làm tổn thương màng (Zhou *et al.*, 2010). Khi tế bào gan bị tổn thương, các enzyme aspartate transaminase (AST) và alanine aminotransferase (ALT) được phóng thích vào máu

làm cho hàm lượng của các enzyme này đo được trong máu tăng cao. Nồng độ các enzyme transaminase trong huyết thanh là dấu hiệu quan trọng để xác định mức độ nghiêm trọng của sự tổn thương gan. Chuột được gây bệnh với CCl₄ làm tăng đáng kể hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh cho thấy gan đã tổn thương (Kandimalla *et al.*, 2016). Nghiên cứu cho thấy, chuột được cho uống CCl₄ (2,5 ml/ kg, CCl₄ tỉ lệ 1:4 trong dầu olive) không gây chết và không ảnh hưởng đến hành vi chung và khối lượng cơ thể. Sau 4 tuần thí nghiệm hàm lượng các enzyme transaminase trong huyết thanh, MDA và GSH trong gan xác định được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Hàm lượng ALT, AST, MDA và GSH của chuột sau thí nghiệm

Nhóm chuột thí nghiệm	Hàm lượng			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	MDA (nM/g)	GSH (nM/g)
Đối chứng sinh lý	132,8 ^d ±49,7	58,6 ^d ±45,9	1,94 ^{bc} ±0,23	548,8 ^b ±162,0
DMSO 1%	112,4 ^d ±26,5	48,6 ^d ±10,7	2,22 ^b ±0,13	526,9 ^b ±47,1
Đối chứng bệnh	1307,8 ^a ±369,9	449,2 ^a ±130,7	10,53 ^a ±1,18	138,0 ^d ±29,5
CCl ₄ , silymarin	219,2 ^{cd} ±65,5	91,2 ^d ±29,3	1,65 ^{bcd} ±0,26	1206,1 ^a ±350,9
CCl ₄ , LRT 100 mg/kg	458,5 ^b ±189,4	293,75 ^b ±150,81	1,46 ^{cd} ±0,15	252,7 ^{cd} ±9,0
CCl ₄ , LRT 200 mg/kg	429,0 ^{bc} ±41,9	255,0 ^{bc} ±54,3	1,27 ^d ±0,11	388,4 ^{bc} ±68,2
CCl ₄ , LRT 400 mg/kg	285,3 ^{bcd} ±80,2	158,5 ^{cd} ±103,1	1,06 ^d ±0,09	398,6 ^{bc} ±83,1

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (p<0,05)

Bảng 3 cho thấy chuột uống CCl₄ có hàm lượng ALT (449,2±130,7 U/L) cao gấp 8 lần so với nhóm chuột bình thường (58,6±45,9 U/L) và AST (1307,8±369,9 U/L) cao gấp 10 lần so với nhóm chuột bình thường (132,8±49,7 U/L), khác biệt rất có ý nghĩa thống kê (p<0,05), kết quả cho thấy chuột đã bị tổn thương gan. Ở nhóm chuột uống CCl₄ và silymarin, hàm lượng ALT và AST đo được lần lượt là 91,2±29,3 U/L và 219,2±65,5 U/L, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm bình thường. Như vậy sử dụng silymarin liều 16 mg/kg có thể bảo vệ gan chống lại tác hại của CCl₄, các nghiên cứu trước đây cho thấy silymarin có khả năng bảo vệ gan khỏi tổn thương do CCl₄ gây ra (Refaey *et al.*, 2015; Duong *et al.*, 2016). Khi cho chuột uống DMSO 1%, hàm lượng ALT và AST đo được không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng bình thường nên việc sử dụng DMSO 1% để pha cao chiết và silymarin không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm.

Theo Federico *et al.* (2017), silymarin có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và proapoptotic có thể ngăn chặn sự khởi đầu và tiến triển của các cơ chế gây tổn thương phát triển viêm gan thành xơ gan và ung thư gan. Cao chiết LRT có hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm nên có khả năng bảo vệ gan.

Chuột được cho uống CCl₄ và điều trị bằng cao chiết LRT liều 100, 200 và 400 mg/kg có hàm lượng ALT, AST đo được giảm dần theo liều dùng và khác biệt có ý nghĩa khi so với nhóm đối chứng bệnh. Nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết LRT liều 100 mg/kg có hàm lượng ALT (293,75±150,81 U/L) và AST (458,5±189,4 U/L) đã giảm hơn 50% so với nhóm đối chứng bệnh, nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết LRT liều 200 mg/kg có hàm lượng ALT (255,0±54,3 U/L) và AST (429,0±41,9 U/L) so với nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết LRT liều 100 mg/kg chưa khác biệt rõ. Riêng nhóm chuột được điều trị bằng cao chiết LRT liều 400 mg/kg có hàm lượng ALT (158,5±103,12 U/L) và AST (285,3±80,20 U/L) tương đương với nhóm chuột được điều trị bằng silymarin (p>0,05) và gần giống với nhóm chuột bình thường. Cao chiết LRT cho thấy khả năng làm giảm các enzyme transaminase tốt hơn so với cao chiết Mơ tròn và cao chiết Cóc mẫn. Cao chiết Mơ tròn (*Paederia foetida*) ở nồng độ 200 mg/kg có hiệu quả làm giảm 64% AST và giảm 65% ALT và ở nồng độ 400mg/kg có thể giảm 82% AST và giảm 74% ALT (Uddin *et al.*, 2011). Ở nồng độ 200 mg/kg cao chiết Cóc mẫn (*Hedyotis corymbosa*) có thể làm giảm 61% AST và 33% ALT (Gupta *et al.*, 2012).

Peroxide hóa lipid là một trong những đặc điểm chính của sự nhiễm độc gan gây ra do CCl₄. Malondialdehyde (MDA) là sản phẩm peroxide hóa lipid, được hình thành bởi các gốc tự do tấn công màng tế bào và được sử dụng rộng rãi như là một dấu chuẩn sinh học về sự tổn thương peroxide hóa lipid (Simeonova *et al.*, 2014). MDA được biết đến như một dấu hiệu của stress oxy hóa (Neetu and Sangeeta, 2011). Ngoài ra, để đánh giá mức độ stress oxy hóa trong cơ thể thì việc xác định hàm lượng glutathione cũng là một trong những định hướng của nhiều nghiên cứu hiện tại. Glutathione (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine) là nhóm thiol nội bào phổ biến nhất, ở dạng khử, glutathione (GSH) là một chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ tế bào khỏi tác hại của gốc tự do, làm giảm chất oxy hóa nội sinh và chống stress oxy hóa ngoại sinh (Yuan and Kaplowitz, 2009; Enns and Cowan, 2017). Vì vậy, xác định hàm lượng MDA và GSH trong gan chuột sẽ góp phần đánh giá được tình trạng tổn thương gan.

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3 cho thấy, gan của nhóm đối chứng bệnh có hàm lượng MDA (10,53±1,18 nM/g) cao hơn khoảng 5 lần so với lượng MDA ở gan chuột bình thường (1,94±0,23 nM/g). Đồng thời, nhóm đối chứng bệnh có lượng GSH (138,0±29,5 nM/g) thấp hơn khoảng 4 lần so với nhóm chuột bình thường (548,8±162,0 nM/g). Sự thay đổi hàm lượng MDA và GSH là do stress oxy hóa và peroxide hóa lipid xảy ra mạnh mẽ ở gan. Ở các nhóm chuột điều trị bằng cao chiết LRT (100, 200 hoặc 400 mg/kg) và silymarin đã cải thiện trạng thái stress oxy hóa và peroxide hóa lipid ở gan theo hướng làm giảm MDA và làm tăng GSH. Ở nhóm chuột điều trị bằng cao chiết LRT 100 mg/kg lượng MDA xác định được (1,46±0,15 nM/g) tương đương với nhóm chuột điều trị bằng silymarin và nhóm bình thường, tuy nhiên lượng GSH xác định được (252,7±9,0 nM/g) vẫn còn thấp. Khi tăng liều điều trị bằng cao chiết LRT 400 mg/kg lượng GSH xác định được (398,6±83,1 nM/g) gần giống với nhóm bình thường. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết LRT có tác dụng làm giảm hàm lượng ALT, AST, MDA và tăng hàm lượng GSH, có hiệu quả tích cực trong việc bảo vệ gan khỏi các tổn thương do CCl₄ gây ra. Hoạt tính bảo vệ gan của cao chiết LRT có được có thể là nhờ vào sự hiện diện của các nhóm hợp chất tự nhiên có hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm đã được phân tích ở trên.

Hoạt tính sinh học của các cao chiết thực vật được cho là do đặc tính chống oxy hóa làm tăng hàm lượng GSH trong máu, tăng protein tổng số, ức chế peroxide hóa lipid và tăng hoạt tính của các enzyme

chống oxy hóa khác (Roy *et al.*, 2014). Khả năng chống oxy hóa của các cao chiết thực vật có được phần lớn là nhờ vào sự hiện diện của nhóm hợp chất polyphenol và flavonoid. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng chứng minh rằng các cao chiết thực vật sở hữu khả năng chống oxy hóa sẽ làm tăng hàm lượng các enzyme chống oxy hóa trong các mô của cơ thể (Huang *et al.*, 2011). Sự kết hợp giữa tác dụng bảo vệ gan và hoạt tính chống oxy hóa làm sạch gốc tự do giúp ngăn chặn quá trình bắt đầu và tiến triển tổn thương của tế bào gan (Gupta *et al.*, 2006). Các quá trình viêm được cho là chịu trách nhiệm sản xuất các gốc tự do ROS và NO có thể gây tổn thương gan hoặc sửa chữa trong gan. Do đó, cao chiết sở hữu hoạt tính chống oxy hóa thường có hoạt tính chống viêm cũng thể hiện hoạt tính bảo vệ gan (Joshy *et al.*, 2016). Chính vì thế mà cao chiết LRT sở hữu hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm cũng góp phần tham gia vào hoạt động bảo vệ gan trên chuột bị tổn thương bởi CCl₄.

4 KẾT LUẬN

Các số liệu trong nghiên cứu này đã chứng minh cao chiết LRT có một số hoạt tính sinh học đáng chú ý như chống oxy hóa, chống viêm *in vitro* và bảo vệ gan trên chuột. Ở các nồng độ được khảo sát, cao chiết LRT đều cho thấy khả năng làm giảm hàm lượng enzyme ALT, AST huyết thanh rất hiệu quả. Bên cạnh đó, cao chiết LRT còn cải thiện được trạng thái stress oxy hóa trong gan qua hiệu quả làm giảm lượng MDA và làm tăng lượng GSH trong mô gan. Kết quả nghiên cứu này được xem như cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phát triển thực phẩm chức năng có tác dụng bảo vệ gan từ cây LRT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agbo, M., Uzor, P., Akazie Nneji, U., Eze Odurukwe, C., Ogbatue, U., & Mbaaji, E., 2015. Antioxidant, total phenolic and flavonoid content of Selected Nigerian medicinal plants. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences. 14(1): 35-41.
- Agrawal, S., Kulkarni, G.T, Sharma, V.N., 2011. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. Free Radicals and Antioxidants. 1(4): 62-68.
- Bag, G.C., Devi, P.G., Bhaigyabati, T., 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* Species of Manipur Valley. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 30(1): 154-159.

- Baharfar, R., Azimi, R., Mohseni, M., 2015. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. aerial parts. *Journal of Food Science and Technology*. 52(10): 6777-6783.
- Banu, S., Bhaskar, B., Balasekar, P., 2012. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Leucas aspera* against d-galactosamine induced liver damage in rats. *Pharmaceutical Biology*. 50(12): 1592-1595.
- Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 91(3): e20190105.
- Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, P.L., Yang, N.S., Shyur L.F., 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7): 3420-3424.
- Chatterjee, R., Mitra, A., 2015. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. *International Immunopharmacology*. 24(2): 335-345.
- Chen, R., He, J., Tong, X., Tang, L., Liu, M., 2014. The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A Review on Phytochemistry, Pharmacology, Quality Control and Pharmacokinetics. *Molecules*. 21(6): 710-740.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., et al., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22: 296-302.
- Lien, D.T.P.L., Hoàng, C.T.K., Hang, T.N., Chu, X.D., Tram, T.B.T.P., Toan, T.T., 2016. Hepatoprotective effect of silymarin on chronic hepatotoxicity in mice induced by carbon tetrachloride. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(5): 262-266.
- Enns, G.M., Cowan, T.M., 2017. Review Glutathione as a Redox Biomarker in Mitochondrial Disease—Implications for Therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 6(5): 50.
- Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C., 2017. Silymarin/silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*. 22(2): 191.
- Gruz, J., Ayaz, F.A., Torun, H., Strnad, M., 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry*. 124(1): 271–277.
- Gupta, A.K., Chitme, H., Dass, S.K., Misra, N., 2006. Hepatoprotective activity of *Rauwolfia serpentina* rhizome in paracetamol intoxicated rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 1(1): 82-88.
- Gupta R.Kr., Singh, R.Kr., Swain, S.R., Hussain, T., Rao, C.V., 2012. Antihepatotoxic potential of *Hedyotis corymbosa* against D-galactosamine-induced hepatopathy in experimental rodents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(3): S1542-S1547.
- Habib, N.C., Serra-Barcellona, C., Honoré, S.M., Genta, S.B., Sánchez, S.S., 2015. Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*. 53(8): 1183-1193.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96: 67-202.
- Huang, L., Guan, T., Qian, Y., et al., 2011. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *European Journal of Pharmacology*. 672: 169-174.
- Huo, H.Z., Wang, B., Liang, Y.K., Bao, Y.Y., Gu, Y., 2011. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(10): 6529-6543.
- Jain, N., Goyal, S., Ramawat, K.G., 2011. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of medical plants used in diet therapy during postpartum healthcare in Rajasthan. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3): 248-253.
- Johnson, O.O., Ayoola, G.A., 2015. Antioxidant activity among selected medicinal plants combinations (multi-component herbal preparation). *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*. 3(1): 526-532.
- Joshy, C., Thahimon, P.A., Kumar, R.A., Carla, B., Sunil, C., 2016. Hepatoprotective, anti-inflammatory and antioxidant activities of *Flacourtia montana* J. Grah leaf extract in male Wistar rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 54(2): 209-217.
- Kandimalla, R., Kalita, S., Saikia, B., et al., 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *Randia dumetorum* Lam. leaf and bark via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Frontiers in Pharmacology*. 7: 205.
- Kang, H., Koppula, S., 2014. Hepatoprotective effect of *Houttuynia cordata* Thunb extract against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 76(4): 267-273.
- Kumaresan, M., Kannan, M., Sankari, A., Chandrasekhar, C.N., Vasanthi, D., 2019. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Jasminum multiflorum* (pink Kakada) leaves and flowers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(3): 1168-1173.

- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., et al., 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(11): 26087-26124.
- Medina, J., R Moreno-Otero 2005. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*. 65: 2445-2461.
- Moreno-Quirós, C.V., Sánchez-Medina, A., Vázquez-Hernández, M., Hernández Reyes, A.G., García-Rodríguez, R.V., 2017. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schldl. & Cham. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10(11): 1047-1053.
- Moron, M., Depierre, J.W., Mannervik, B., 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activity in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 582: 67-78.
- Nandhakumar, E., Indumathi, P., 2013. *In vitro* antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 6(3): 142-148.
- Neetu, S., Sangeeta, S., 2011. Hepatoprotective potential of aqueous extract of *Butea monosperma* against CCl₄ induced damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63: 671-676.
- Nguyen Q-V., Eun, J-B., 2011. Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(13): 2798-2811.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Tp. HCM. 80-147.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 95: 351-358.
- Ojha, S., Raj, A., Roy, A., Roy, S., 2018. Extraction of total phenolics, flavonoids and tannins from *Paederia foetida* L. leaves and their relation with antioxidant activity. *Pharmacognosy Journal*. 10(3): 541-547.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44: 307-315.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 5: e47.
- Phạm Hoàng Hộ, 2003. Cây cỏ Việt Nam, tập 3. Nhà xuất bản Trẻ. Tái bản lần 2. 107.
- Prakash, A., Rigelhof, F., Miller, E., 2000. Antioxidant activity. *Analytical progress Medallion Laboratories*. 1-4.
- Prakash, D., Bindal, M.C., Gupta, S.K., 2013. Antiarthritic activity of milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. *International Research Journal of Pharmacy*. 4: 158-160.
- Refaey, M.S., Mustafa, M.A.H., Mohamed, A.M., Ali, A.A., 2015. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Odontonema cuspidatum* (Nees) Kuntze against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(2): 89-96.
- Rajeswaramma, R., Jayasree, D., 2018. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* seed extract. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 17(1): 18-22.
- Roy, A., Bhoumik, B., Sahu, R.K., Dwivedi, J., 2014. Medicinal plants used in liver protection - A review. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*. 2(1): 23-33.
- Sawadogo, W.R., Meda, A., Lamien, C., Kiendrebeogo, M., Gissou, I.P., Nacoulma, O.G., 2006. Phenolic content and antioxidant activity of six Acanthaceae from Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*. 6(2): 249-252.
- Shah M., Parveen, Z., Khan, M.R., 2017. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17: 526.
- Shravan, K.N., Kishore, G., Siva, K.G., Sindhu, E.S., 2011. *In vitro* anti-inflammatory and antiarthritic activity of leaves of *Physalis angulata* L. *International Journal of Pharmacy and Industrial. Research*. 1(3): 211-213.
- Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Mitcheva, M., 2014. some *in vitro/in vivo* chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats. *BioMed Research International*. Volume 2014, Article ID 706302:1-6.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Traber, M.G., Stevens, J.F., 2011. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*. 51(5): 1000-1013.
- Uddin, B., Nahar, T., Basunia, M.A., Hossain, S., 2011. *Paederia foetida* protects liver against hepatotoxin-induced oxidative damage. *Advances in Biological Research*. 5(5): 267-272.

- Ullah, H.M.A., Zaman, S., Juhara, F., et al., 2014. Evaluation of antinociceptive, *in-vivo* & *in-vitro* anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14: 346.
- Yuan, L., Kaplowitz, N., 2009. Review Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. Molecular Aspects of Medicine. 30(1-2): 29-41.
- Zhao, Y., Chen, S., Wang, Y., Ly, C., Wang, J., Lu, J., 2018. Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai. Journal of Food and Drug Analysis. 26(2): 796-806.
- Zhou, D., Ruan, J., Cai, Y., Xiong, Z., Fu, W., Wei, A., 2010. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanol extract of *Arachniodes exilis* (Hance) Ching. Journal of Ethnopharmacology. 129(2): 232-237.