



Original Article

# Evaluating the Antioxidant and Xanthine Oxidase Enzyme Inhibitory Activities *in vitro* of *Piper betle* Linn. Leaf Extract

Bui Thanh Tung\*, Duong Thi Kỳ Duyên, Bui Son Nhat

<sup>1</sup>VNU School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi,  
144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 15 April 2020

Revised 05 May 2020; Accepted 20 June 2020

**Abstract:** In this study, leaves of *Piper betle* L. were extracted by ultrasonic with ethanol 50% and successively fractionated with n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) and n-butanol (n-BuOH) solvents. These fractions were evaluated for their antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities *in vitro*. The study results show that EtOAc fraction had the highest antioxidant effect ( $IC_{50}$ :  $15.54 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$ ), followed by EtOH fraction ( $IC_{50}$ :  $31.31 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ), n-hexane fraction ( $IC_{50}$ :  $83.67 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ ), and the lowest was n-BuOH fraction ( $IC_{50}$ :  $95.60 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$ ). The evaluation of XO enzyme inhibition shows that EtOAc fraction extract had the strongest XO enzyme inhibitory activity ( $IC_{50}$ :  $29.65 \pm 0.93 \mu\text{g/mL}$ ), followed by n-BuOH fraction ( $IC_{50}$ :  $37.22 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ ), EtOH fraction ( $IC_{50}$ :  $52.13 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$ ), and the lowest was n-hexane fraction ( $IC_{50}$ :  $80.12 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ ). These results indicate that the EtOAc fraction from the leaf of *Piper betle* L. can be used for the prevention and treatment of gout.

**Keywords:** Gout, *Piper betle* Linn., xanthine oxidase, antioxidant activity.

\* Corresponding author.

E-mail address: [tungasia82@gmail.com](mailto:tungasia82@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4231>

# Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* của cao chiết lá Trà không (*Piper betle* L.)

Bùi Thanh Tùng\*, Dương Thị Kỳ Duyên, Bùi Sơn Nhật

Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 4 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 05 tháng 5 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 20 tháng 6 năm 2020

**Tóm tắt:** Xanthine oxidase (XO) là một enzym có vai trò quan trọng trong tổng hợp acid uric. Các chất ức chế enzym XO làm giảm sinh tổng hợp acid uric đã được sử dụng để phòng và điều trị bệnh gút. Trong nghiên cứu này, lá Trà không (*Piper betle* L.) được chiết bằng phương pháp siêu âm sử dụng ethanol 50% và các phân đoạn dịch chiết thu được bằng cách sử dụng các dung môi n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH). Dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết được đánh giá tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym XO trên *in vitro*. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có tác dụng chống oxy hóa cao nhất ( $IC_{50}$ :  $15,54 \pm 0,48$   $\mu\text{g/mL}$ ), sau đó là dịch chiết ethanol toàn phần ( $IC_{50}$ :  $31,31 \pm 0,12$   $\mu\text{g/mL}$ ) và phân đoạn n-hexane ( $IC_{50}$ :  $83,67 \pm 0,14$   $\mu\text{g/mL}$ ), thấp nhất là phân đoạn n-BuOH ( $IC_{50}$ :  $95,60 \pm 0,37$   $\mu\text{g/mL}$ ). Đánh giá khả năng ức chế enzym XO cho thấy phân đoạn dịch chiết EtOAc có tác dụng ức chế enzym XO mạnh nhất ( $IC_{50}$ :  $29,65 \pm 0,93$   $\mu\text{g/mL}$ ), các phân đoạn khác có tác dụng ức chế enzym XO giảm dần là phân đoạn n-BuOH ( $IC_{50}$ :  $37,22 \pm 1,23$   $\mu\text{g/mL}$ ) và EtOH ( $IC_{50}$ :  $52,13 \pm 0,56$   $\mu\text{g/mL}$ ); phân đoạn n-hexane có tác dụng ức chế enzym XO yếu nhất ( $IC_{50}$ :  $80,12 \pm 0,21$   $\mu\text{g/mL}$ ). Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng phân đoạn EtOAc từ lá Trà không có tiềm năng trong phòng và điều trị bệnh gút.

**Từ khóa:** Gút, lá Trà không, xanthine oxidase, chống oxy hóa.

## 1. Mở đầu

Bệnh gút là tình trạng bệnh lý gồm nhiều thời kỳ viêm khớp tái đi tái lại, tương ứng với sự hiện diện của các tinh thể acid uric hoặc tinh thể muối urat lắng đọng trong khớp và các mô, gây ra do sự siêu bão hòa urate ngoại bào. Tăng acid uric máu, nồng độ urate trong huyết thanh vượt quá giới hạn hòa tan ( $\leq 7,0$  mg/dL), là yếu tố nguy cơ quan trọng nhất đối với sự phát triển của bệnh gút [1]. Đây là bệnh do rối loạn chuyển hóa nhân purin, thuộc nhóm bệnh rối loạn chuyển hóa. Nguyên nhân gây tăng acid uric máu có thể do tăng sản xuất, giảm thải trừ acid uric hoặc

cả hai. Xanthine oxidase là một enzym có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp acid uric. Enzym này xúc tác phản ứng oxy hóa hypoxanthine thành xanthine và phản ứng oxy hóa xanthine thành acid uric [2]. Đây là hai phản ứng trong giai đoạn cuối của quá trình chuyển hóa các base purin trong cơ thể. Khi enzyme Xanthine oxydase (XO) hoạt động, dẫn đến hình thành các gốc tự do, góp phần gây tổn thương oxy hóa đến lipid, protein và ADN, là nguyên nhân liên quan đến nhiều quá trình bệnh lý bao gồm viêm, xơ vữa động mạch, ung thư, lão hóa và bệnh gút. Nhiều nghiên cứu về enzym XO chứng minh rằng, hoạt động của enzym XO là

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tungasia82@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4231>

nguyên nhân dẫn tới sự tạo ra nhiều gốc tự do. Nên các chất ức chế enzyme XO vừa có tác dụng ức chế tạo thành acid uric ngăn ngừa bệnh gút, vừa có tác dụng chống lại stress oxy hóa là nguyên nhân gây tổn thương tế bào và mô trong cơ thể [3]. Hiện nay, những tác nhân hóa học ức chế enzyme XO thường gây nhiều phản ứng phụ nên việc tìm kiếm các chất mới có nguồn gốc tự nhiên vẫn đang được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới.

Trầu không có tên khoa học *Piper betle* Linn., họ Piperaceae. Nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy sự có mặt của các hợp chất phenolic, flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, steroid, terpenoid, carbohydrate, protein trong lá Trầu không [4-6]. Nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy Flavonoid trong lá Trầu không có tác dụng chống oxy hóa và có khả năng hoạt động như chất ức chế hoạt động của XO [7-9]. Theo kinh nghiệm dân gian, lá trầu không được sử dụng để điều trị bệnh gút. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu khoa học nào được công bố về tác dụng điều trị bệnh gút của lá Trầu không. Do đó, đề tài được thực hiện để đánh giá tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzyme xanthine oxidase *in vitro* của lá Trầu không nhằm góp phần sàng lọc tìm kiếm các dược liệu có khả năng phòng và hỗ trợ điều trị bệnh gút.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu: lá Trầu không được thu hái tại Hà Nội vào tháng 7 năm 2019. Mẫu tiêu bản được lưu tại Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Mẫu thực vật được Bộ môn Dược liệu & Dược học cổ truyền, Khoa Y Dược giám định tên khoa học là *Piper betle* Linn., họ Piperaceae.

### 2.2. Hóa chất

Enzyme xanthine oxidase (từ sữa bò, 1 U/mg protein, 7,6 mg protein/mL, Sigma Singapore), Xanthine (>99%), Allopurinol (STADA); Natri dihydro phosphate, dinatri hydro phosphate, acid hydrochloric, natri hydroxyd (Trung Quốc); 2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Singapore); acid ascorbic 99% (Trung Quốc). Các dung môi: ethanol, n-hexan, ethyl acetate, n-butanol, dimethyl sulfoxid (DMSO) (Trung Quốc), methanol (MeOH) (Merck, Đức); nước cất.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp chiết xuất

Lá Trầu không phơi khô sơ chế, đem 330g dược liệu ngâm chiết siêu âm bằng dung môi ethanol 50%, ở 40°C trong vòng 2 giờ, lặp lại 3 lần. Lọc các dịch chiết của ethanol qua giấy lọc, gộp dịch lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết tổng ethanol (82 g). Cao chiết được phân tán vào nước cất tỷ lệ 1:1 và chiết phân bố lần lượt bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần n-hexan, ethyl acetat và n-butanol (mỗi dung môi 3 lần, mỗi lần 150 mL). Các phân đoạn được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được phân đoạn tương ứng là n-hexan, EtOAc và n-BuOH.

#### 2.3.1. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Hợp chất 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra gốc tự do bền trong dung dịch MeOH, dung dịch có màu tím đỏ phản ứng với các chất chống oxy hóa để tạo ra phức hợp màu vàng không hấp thụ ánh sáng tử ngoại tại bước sóng 517 nm. Khi cho chất vào dung dịch này nếu chất có khả năng quét các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Mẫu thử được pha trong dung môi MeOH thành các nồng độ khác nhau (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 và 100 mg/mL). Hỗn hợp phản ứng gồm: 340 µL dung dịch DPPH (nồng độ 0,24 mg/mL) trong MeOH, 100 µL dung dịch thử các mẫu và 560 µL MeOH được ủ ở 25°C trong 15 phút. Song song với mỗi mẫu thử, tiến hành mẫu chứng với cùng điều kiện và thành phần gồm: 660 µL MeOH và 340 µL dung dịch DPPH (nồng độ 0,24 mg/mL trong MeOH). Tiến hành đo hấp thụ tại bước sóng 517 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính quét gốc tự do DPPH được đánh giá thông qua giá trị phần trăm ức chế I (%) và được tính theo công thức:

$$\% I = \frac{Ac - At}{Ac - Ao} \times 100$$

Trong đó:

% I: Hoạt tính chống oxy hóa;

Ac: Độ hấp thụ của mẫu chứng (không chứa 100  $\mu$ L dung dịch thử);

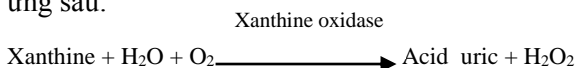
At: Độ hấp thụ của mẫu thử;

Ao: Độ hấp thụ của mẫu trắng (sử dụng MeOH).

Tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết được so sánh với chất chuẩn dương là acid ascorbic. Giá trị chống oxy hóa IC<sub>50</sub> của mẫu được tính dựa theo đồ thị nồng độ mẫu thử (C) và phần trăm ức chế (I%).

### 2.3.2. Đánh giá tác dụng ức chế enzym xanthine oxidase

Nguyên tắc của phương pháp dựa trên sự tạo thành acid uric từ xanthine nhờ xúc tác của enzym XO. Thí nghiệm được tiến hành dựa trên phương pháp của M.Umamaheswari và cộng sự (2007), Tadataka Noro và cộng sự (1983) có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [10,11]. Nguyên tắc định lượng dựa trên phản ứng sau:



Hoạt độ XO được xác định thông qua lượng acid uric tạo thành được đo ở bước sóng 295 nm ở 37°C, pH 7,5 hoặc 8,0. Một đơn vị enzym được định nghĩa là tổng lượng enzym sản xuất ra 1  $\mu$ mol acid uric trong mỗi phút ở nhiệt độ 37°C.

Cách tiến hành

Mẫu thử được pha trong dung môi dimethyl sulfoxid (DMSO thành các nồng độ khác nhau (5; 10; 25; 50 và 100  $\mu$ g/mL). Hỗn hợp phản ứng gồm: 100  $\mu$ L dung dịch mẫu thử, 400  $\mu$ L dung dịch đệm phosphat (50 mM, pH = 7,5), 100  $\mu$ L dung dịch enzym XO 0,2 U/mL trong dung dịch đệm phosphat (pha ngay trước khi tiến hành phản ứng). Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 15

phút, sau đó thêm 200  $\mu$ L xanthine (0,15 mM) trong dung dịch đệm rồi ủ tiếp 30 phút. Dùng phản ứng bằng cách thêm 200  $\mu$ L HCl 0,5 M. Hỗn hợp phản ứng được đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 295 nm. Mẫu chứng được tiến hành tương tự nhưng dung dịch thử được thay bằng dung dịch đệm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Tác dụng ức chế hoạt động của enzym XO được tính theo công thức:

$$\% I = \frac{\Delta OD_{\text{chứng}} - \Delta OD_{\text{thử}}}{\Delta OD_{\text{chứng}}} \times 100\%$$

Trong đó: I% phần trăm hoạt tính XO bị ức chế;

$\Delta OD_{\text{chứng}} = OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{trắng chứng}}$  là độ hấp thụ của mẫu chứng;

$\Delta OD_{\text{thử}} = OD_{\text{thử}} - OD_{\text{trắng thử}}$  là độ hấp thụ của mẫu thử;

IC<sub>50</sub>: là nồng độ mà tại đó ức chế 50% hoạt độ xanthine oxidase.

Giá trị IC<sub>50</sub> được tính dựa vào đồ thị và phương trình biểu diễn nồng độ và % ức chế enzym XO của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết từ lá Tràu không.

### 2.3.3. Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được lưu trữ và xử lý thống kê sử dụng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 và phần mềm Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc, Mỹ). Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $X \pm SD$  (X: giá trị trung bình của mẫu thử; SD: độ lệch chuẩn).

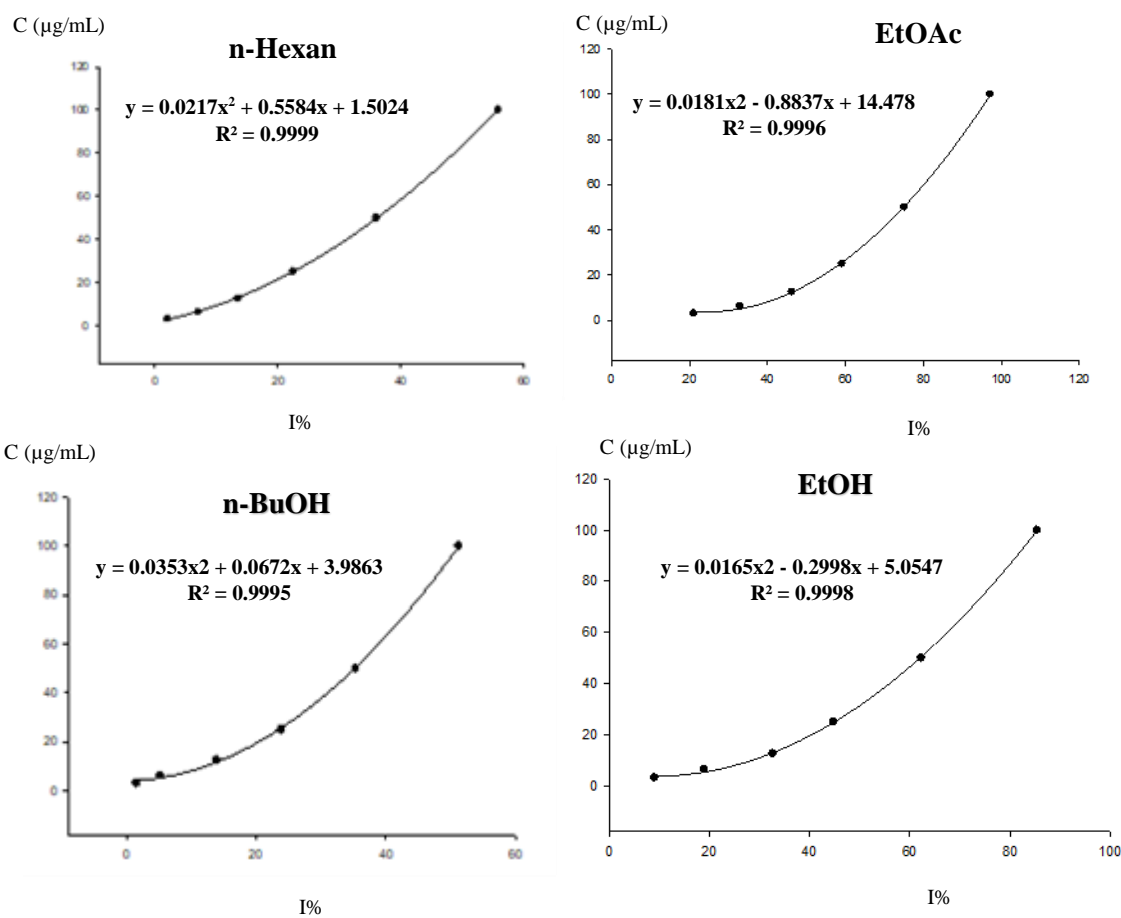
## 3. Kết quả nghiên cứu

### 3.1. Kết quả đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Giá trị phần trăm ức chế I (%) của cao chiết toàn phần và các phân đoạn cao chiết ở nồng độ khác nhau từ lá Tràu không được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Khả năng chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không ở các nồng độ khác nhau

Phân đoạn	% ức chế tại các nồng độ (µg/mL)						Giá trị IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	
Ethanol	85,43±0,68	62,31±0,12	44,82±0,11	32,66±0,34	19,00±0,04	9,05±0,64	31,31±0,12
n-Hexan	55,78±0,35	35,98±0,41	22,41±0,31	13,47±0,42	7,04±0,15	2,01±0,71	83,67±0,14
EtOAc	97,19±0,5	75,08±0,36	59,10±0,15	46,23±0,09	32,86±0,27	21,00±0,23	15,54±0,48
n-BuOH	51,16±0,45	35,28±0,54	23,82±0,27	13,87±0,18	5,23±0,41	1,51±0,6	95,60±0,37



Hình 1. Đồ thị biểu diễn khả năng chống oxy hóa của của cao chiết toàn phần và các phân đoạn.

Từ kết quả ở Bảng 1 tác dụng chống oxy hóa tăng dần theo nồng độ. Dịch chiết ethanol toàn phần từ lá Trà không thể hiện tác dụng chống oxy hóa *in vitro* với giá trị IC<sub>50</sub> tính được là 31,31 ± 0,12 µg/mL. Trong các phân đoạn dịch chiết, phân đoạn EtOAc thể hiện tác dụng chống oxy hóa *in vitro* mạnh nhất với I% ở nồng độ cao nhất 100 µg/mL là 97.19 ± 0,74 %, giá trị IC<sub>50</sub> tính được là 15,54 ± 0,48 µg/mL. Tiếp theo là phân

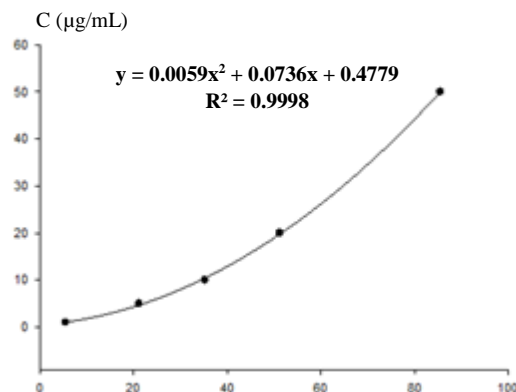
đoạn n-Hexan với giá trị I% đạt 55.78 ± 0,93 % ở nồng độ cao nhất 100 µg/mL, giá trị IC<sub>50</sub> tính được là 83,67 ± 0,14µg/mL. Phân đoạn n-BuOH thể hiện tác dụng chống oxy hóa yếu với giá trị IC<sub>50</sub> tính được là 95,60 ± 0,37 µg/mL. Song song với các mẫu thử, tiến hành tương tự với mẫu chứng dương acid ascorbic cho thấy tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của acid ascorbic thể hiện qua giá trị IC<sub>50</sub> là 18,91 ± 0.34 µg/mL (Hình 2).

Bảng 2. Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của Acid ascorbic

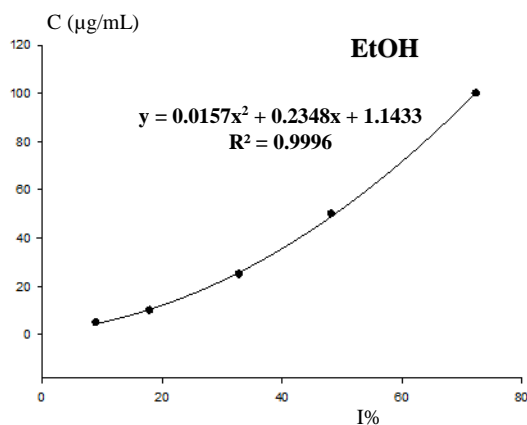
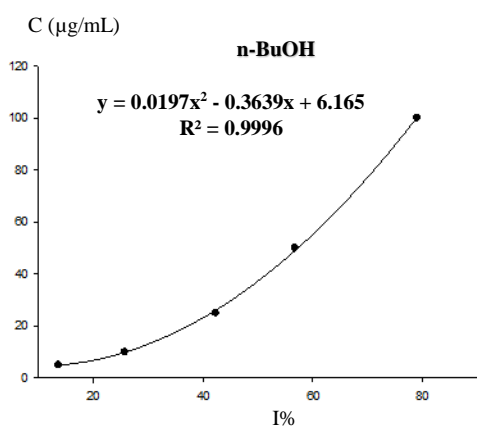
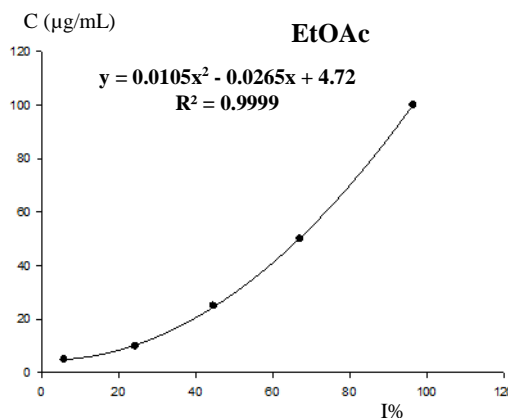
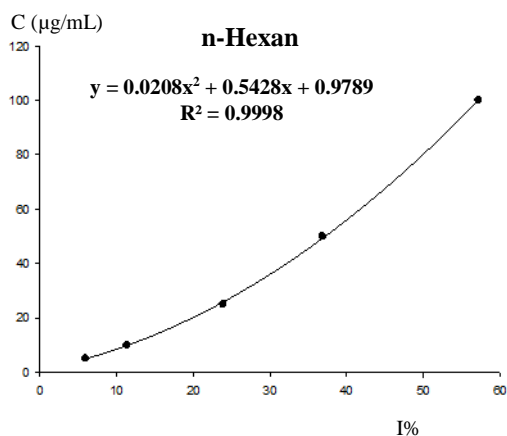
Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế (I%)
1	5,53±0,57
5	21,21±0,48
10	35,28±1,14
20	51,26±1,57
50	85,53±2,46

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và các phân đoạn cao chiết từ lá Trà không lên hoạt độ enzym xanthine oxidase *in vitro*

Giá trị phần trăm ức chế I (%) của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết ở nồng độ khác nhau từ lá Trà không được trình bày ở Bảng 2 và Hình 3.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn khả năng chống oxy hóa *in vitro* của acid ascorbic.



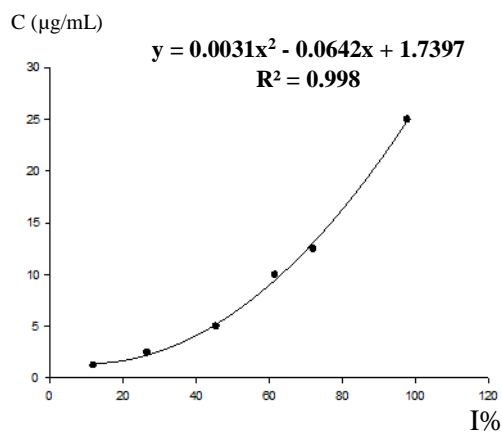
Hình 3. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzym XO *in vitro* của cao chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không ở các nồng độ khác nhau.

Bảng 3. Khả năng ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không ở các nồng độ khác nhau

Phân đoạn	% ức chế tại các nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )					Giá trị $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	100	50	25	10	5	
Ethanol	72,34 $\pm$ 0,67	48,23 $\pm$ 0,21	32,86 $\pm$ 0,47	17,97 $\pm$ 0,83	8,98 $\pm$ 0,86	52,13 $\pm$ 0,56
n-Hexan	57,21 $\pm$ 0,94	36,88 $\pm$ 0,76	23,88 $\pm$ 0,95	11,35 $\pm$ 0,67	5,91 $\pm$ 0,58	80,12 $\pm$ 0,21
EtOAc	96,45 $\pm$ 0,86	67,14 $\pm$ 1,12	44,68 $\pm$ 0,63	24,35 $\pm$ 0,34	5,91 $\pm$ 0,46	29,65 $\pm$ 0,93
n-BuOH	78,96 $\pm$ 0,77	56,74 $\pm$ 0,98	42,32 $\pm$ 0,56	25,77 $\pm$ 0,56	13,71 $\pm$ 1,23	37,22 $\pm$ 1,23

Bảng 4. Khả năng ức chế enzym XO *in vitro* của Allopurinol

Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phần trăm ức chế (I%)
1,25	12,1 $\pm$ 1,24
2,5	26,7 $\pm$ 2,65
5	45,6 $\pm$ 2,36
10	61,7 $\pm$ 2,45
12,5	72,1 $\pm$ 2,14
25,0	97,9 $\pm$ 1,87

Hình 4. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* của Allopurinol.

Allopurinol thể hiện khả năng ức chế enzym XO phụ thuộc vào nồng độ, ở các nồng độ khác nhau thể hiện sự ức chế rõ rệt hoạt động của enzym XO, nồng độ càng lên cao, khả năng ức chế càng lớn. Nồng độ Allopurinol 1,25  $\mu\text{g/mL}$  hiệu suất ức chế chỉ đạt 12,1%, nhưng khi tăng nồng độ Allopurinol lên lần lượt là 2,5; 5; 10 và 12,5  $\mu\text{g/mL}$  hiệu suất ức chế cũng tăng đạt kết quả lần lượt là 26,7%, 45,6%, 61,7% và 72,1%. Tại nồng độ 25  $\mu\text{g/mL}$  khả năng ức chế cao nhất, đạt 97,9%. Theo đồ thị Hình 4, tác dụng ức chế

enzym XO *in vitro* của Allopurinol thể hiện qua giá trị  $\text{IC}_{50}$  là 6,28  $\pm$  0,31  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4. Bàn luận

Nhiều nghiên cứu về enzym XO chứng minh rằng, hoạt động của enzym XO là nguyên nhân dẫn tới sự tạo ra nhiều gốc tự do. Nên việc bổ sung các chất ức chế enzym XO vừa có tác dụng ức chế tạo thành acid uric ngăn ngừa bệnh gút, vừa có tác dụng ngăn chặn lại stress oxy hóa là nguyên nhân gây tổn thương tế bào và mô trong cơ thể [3,12,13]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng chống oxy hóa và khả năng ức chế enzym XO của lá Trà không bởi đây là một dược liệu rẻ, dễ kiếm và kết quả nghiên cứu đã mở ra hướng mới cho việc sử dụng lá Trà không làm nguồn dược liệu tiềm năng để nghiên cứu các chất ức chế XO, hay các hợp chất mới có hoạt tính chữa trị cao và ít tác dụng phụ nhất của lá Trà không từ các nghiên cứu *in vivo* trong tương lai, nhất là các chất từ phân đoạn n-BuOH và phân đoạn EtOAc.

Phương pháp DPPH là một trong các phương pháp được sử dụng rộng rãi trong các mô hình nghiên cứu đánh giá khả năng chống oxy hóa của các chất trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới. Vì thế trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng phương pháp DPPH để đánh giá tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không. Hơn nữa, đây là phương pháp nhanh, cho kết quả khá chính xác, dễ thực hiện và ít tốn kém.

Kết quả nghiên cứu cao từ dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không cho thấy phân đoạn EtOAc có tác dụng quét các gốc tự do DPPH tốt nhất với  $\text{IC}_{50}$  là 15,54  $\pm$  0,48

$\mu\text{g/mL}$ ; tác dụng chống oxy hóa giảm dần ở các phân đoạn EtOH, n-hexan và n-BuOH. Nghiên cứu đã sử dụng chất đối chứng acid ascorbic, là chất chuẩn dương thông dụng được sử dụng trong nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa bằng phương pháp quét gốc tự do DPPH. Kết quả thu được giá trị  $\text{IC}_{50}$  của acid ascorbic là  $18,91 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$ . Khả năng quét các gốc tự do trong dịch chiết lá trà không chủ yếu là do các hợp chất polyphenol như chatecol, chavibetol, allylpyrocatechol, eugenol, hydroxychavicol và flavonoid... Bên cạnh đó, một số thành phần tinh dầu của lá trà không, như vitamin C, vitamin A, vitamin E, terpens và các dẫn xuất terpen,... cũng góp phần vào đặc tính chống oxy hóa. Điều này cùng với kết quả đánh giá đã chứng tỏ các chất có khả năng quét gốc tự do chủ yếu nằm trong phân đoạn EtOAc, sau đó đến phân đoạn EtOH. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Chandra Risdian và cộng sự đã kết luận phân đoạn EtOAc từ chiết xuất lá Trà không có tác dụng quét các gốc tự do DPPH mạnh nhất trong các phân đoạn EtOH, n-hexan, n-BuOH, hàm lượng phenolic được tìm thấy cao nhất trong phân đoạn EtOAc và EtOH [7].

Bên cạnh liệu pháp chống oxy hóa thì một hướng điều trị nữa được tiến hành nghiên cứu trong điều trị bệnh gút là nghiên cứu về khả năng ức chế enzym XO- enzym xúc tác phản ứng oxy hóa hypoxanthine thành xanthine và phản ứng oxy hóa xanthine thành acid uric, là cơ chế bệnh sinh chính của bệnh gút. Với nhiều ưu điểm hơn các phương pháp khác, phương pháp đo quang của M.Umamaheswari được chúng tôi sử dụng để đánh giá tác dụng ức chế enzym XO của các mẫu thử với một số thay đổi cho phù hợp với điều kiện nghiên cứu. Chúng tôi sử dụng chất đối chứng là Allopurinol - một thuốc ức chế mạnh XO cả *in vitro* và *in vivo* có tác dụng làm hạ acid uric huyết thanh trên lâm sàng, được sử dụng làm chất đối chứng trong thử nghiệm đánh giá tác dụng ức chế enzym XO. Kết quả cho thấy Allopurinol thể hiện khả năng ức chế XO rõ rệt với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là  $6,28 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ , tương đồng với các nghiên cứu trước đây như của Vikrama Chakravarthi P và cộng sự [15]. Vì vậy phương pháp và chất đối chứng lựa chọn là phù hợp với

thí nghiệm này, có thể dùng để đối chứng trực tiếp với các giá trị ức chế  $\text{IC}_{50}$  của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết lá Trà không.

Kết quả nghiên cứu chúng tôi đã chỉ ra rằng dịch chiết ethanol toàn phần và các phân đoạn n-hexan, phân đoạn EtOAc, phân đoạn n-BuOH từ lá Trà không thể hiện tác dụng ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* với  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $52,13 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ ;  $80,12 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ ;  $29,65 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$ ;  $37,22 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ . Điều này chứng tỏ, trong cao chiết ethanol và các phân đoạn cao chiết n-hexan, EtOAc và n-BuOH đều chứa chất có hoạt tính ức chế enzym XO và khi các nồng độ biến thiên thì hoạt tính ức chế enzym XO cũng biến thiên theo. Kết quả nghiên cứu khá tương đồng với các nghiên cứu trước đây khi tác giả Vikrama Chakravarthi P và cộng sự đã nghiên cứu về khả năng ức chế enzym XO của dịch chiết lá Trà không, chỉ ra hoạt động ức chế XO đáng kể [13]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy phân đoạn EtOAc có tác dụng ức chế enzym XO mạnh nhất trong các phân đoạn ( $\text{IC}_{50}$ :  $29,65 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$ ) có thể giải thích là do hàm lượng các chất có hoạt tính ức chế enzym XO có mặt nhiều nhất trong phân đoạn EtOAc, điển hình là các hợp chất flavonoid- nhóm hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mạnh với nhiều tác dụng quan trọng như: chống oxy hóa, bảo vệ gan, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư, chống viêm, chống dị ứng,... Ngoài hoạt tính chống oxy hóa, một số flavonoid được chứng minh đã thể hiện tác dụng ức chế trên enzym xanthine oxidase (XO) sản xuất hydrogen peroxide và anion superoxide trong quá trình oxy hóa hypoxanthine thành xanthine, sau đó xanthine thành acid uric [14], chứng tỏ mối liên hệ giữa stress oxy hóa và bệnh gút.

Như vậy, phân đoạn EtOAc thể hiện khả năng quét gốc DPPH cao nhất (với  $\text{IC}_{50}$  là  $15,54 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ ) và hoạt tính ức chế XO *in vitro* mạnh nhất với  $\text{IC}_{50}$  là  $29,65 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$ . Sự ức chế hoạt động enzym XO cũng được xem như là một cơ chế chống oxy hóa của các hợp chất polyphenol và flavonoid có mặt trong phân đoạn cao chiết EtOAc. Mặt khác, các alkaloid có trong lá Trà không cũng được chứng minh có tác dụng ức chế sự sản sinh acid uric thông qua hoạt



động ức chế enzym XO [15]. Kết quả của nghiên cứu này đã chỉ ra rằng các hợp chất hoạt tính sinh học trong chiết xuất lá Trầu không có khả năng ức chế hoạt động của enzyme XO *in vitro*, đồng thời quét sạch gốc tự do, làm giảm stress oxy hóa là do tác dụng hiệp đồng của các hợp chất trong phân đoạn dịch chiết này. Hướng nghiên cứu tiếp theo nên tập trung vào phân lập, xác định hợp chất và làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của các hợp chất, từ đó tiếp tục thử nghiệm *in vitro* và thử nghiệm lâm sàng trong tương lai.

## 5. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym xanthine oxidase *in vitro* của dịch chiết toàn phần và các phân đoạn dịch chiết từ lá Trầu không. Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn EtOAc có tác dụng chống oxy hóa cao nhất ( $IC_{50}$  là  $15,54 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ ). Đồng thời, phân đoạn EtOAc cũng có khả năng ức chế enzym XO mạnh nhất đạt  $IC_{50}$  bằng  $29,65 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$ . Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của phân đoạn EtOAc để phân tách được hoạt chất tinh khiết có tiềm năng trong phòng, điều trị bệnh gút.

## Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số đề tài CS.19.07.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Y. Niu, W. Lu, L. Gao, H. Lin, X. Liu, L. Li. Reducing effect of mangiferin on serum uric acid levels in mice. *Pharmaceutical Biology* 50(9) (2012) 1177.
- [2] M. Zarepour, K. Kaspari, S. Stagge S, R. Rethmeier, R.R, Mendel, F. Bittner. Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Molecular Biology* 72 (2010) 301.
- [3] Cotelle N. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(6) (2001) 569.
- [4] S. Das, R. Parida, I.S. Sandeep, S. Nayak, Mohanty, S. Biotechnological intervention in betelvine (*Piper betle* L.): A review on recent advances and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9(10) (2016) 938.
- [5] V. Dwivedi, S. Tripathi. Review study on potential activity of *Piper betle*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(4) (2014) 93.
- [6] H.P. Baviskar, G.T. Dhake, M.A. Kasai, N.B. Chaudhari, T.A. Deshmukh. Review of *Piper Betle*. *Research Journal of Phamacognosy and Phytochemischy* 9(2) (2017).
- [7] C. Risdian, W. Widowati, T. Mozef, T.L. Wargasetia, K. Khiong. Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Leaves Extract and Its Different Solvent Fractions of *Piper betle* L. *In Vitro*. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 2(1) (2011) 141.
- [8] D. Rintu, M. Shinjini, M. Kaustab, P. Pramathadhip, P.S. Umesh, E.R. Banerjee. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activities of Different Varieties of Piper Leaf Extracts (*Piper Betle* L.). *Journal of Nutrition & Food Sciences* 5(5) (2015).
- [9] K.Y. Pin, A. L. Chuah, A. A. Rashih, M.P. Mazura, J. Fadzureena, S. Vimala, M.A. Rasadah. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts of betel leaves (*Piper betle*) from solvents with different polarities. *Journal of Tropical Forest Science* 22(4) (2010) 448.
- [10] T. Noro et al, Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 31(11) (1983) 3984.
- [11] M. Umamaheswari, K. AsokKumar, A. Somasundaram, T. Sivashanmugam, V. Subhadradevi, T.K. Ravi. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology* 109(3) (2007) 547.
- [12] D.E. Van Hoorn, et al, Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids *European journal of pharmacology* 451(2) (2002) 111.
- [13] N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry* 1(6) (2001) 569.
- [14] J.M. McCord. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 312(3) (1985) 159.
- [15] P.V. Chakravarthi, S. Murugesan, A. Arivuchelvan, K. Sukumar, A. Arulmozhi, A. Jagadeeswaran. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of *Piper betle* and *Phyllanthus niruri*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(5) (2018) 959.