



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.124

HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ BẢO VỆ GAN CỦA CAO CHIẾT LÁ GÁO TRẮNG (*Neolamarckia cadamba* (ROXB.) BOSSER)

Phan Kim Định, Nguyễn Trọng Tuân và Đái Thị Xuân Trang*

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/03/2019

Ngày nhận bài sửa: 07/05/2019

Ngày duyệt đăng: 30/10/2019

Title:

Antioxidant and hepatoprotective activities of the methanol leaf extract of *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser

Từ khóa:

Bảo vệ gan, chống oxy hóa, *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser, tetrachloric carbon (CCl₄)

Keywords:

Antioxidant, carbon tetrachloride (CCl₄), hepatoprotection, *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser

ABSTRACT

The chemical composition of Gao trang leaves (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser) contained alkaloids, flavonoids, glycosides, polyphenols, tannins and triterpenoids. The total polyphenol and flavonoid contents of *N. cadamba* were equivalent to 376.43±2.22 mg GAE/g and 613.53±90.39 mg QE/g, respectively. The antioxidant activities of the extract of *N. cadamba* leaves were investigated by DPPH free radical scavenging and reducing power (RP) assays. The leaf extract possessed relatively high antioxidant activity, with EC₅₀ value of 52.69 µg/mL and OD_{0.5} value of 89.68 µg/mL, which were higher than that of references as vitamin C and BHA 1.13 times and 2.97 times, respectively. The hepatoprotective activity of the leaf extract was investigated in mice which were previously treated with CCl₄ to induce liver damage. The leaf 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. The leaf 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

Cao lá Gáo trắng - GT (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser) có chứa các thành phần hóa học bao gồm alkaloid, flavonoid, glycoside, phenol, tannin, triterpenoid. Hàm lượng polyphenol và flavonoid được xác định lần lượt là 376,43±2,22 mg GAE/g và 613,53±90,39 mg QE/g. Hoạt tính chống oxy hóa của cao lá GT được khảo sát bằng các phương pháp DPPH và khử sắt (RP). Kết quả cho thấy, cao lá GT có khả năng chống oxy hóa khá tốt với EC₅₀ = 52,69 µg/mL và OD_{0,5} = 89,68 µg/mL, lần lượt cao hơn chất chuẩn vitamin C và BHA là 1,13 lần và 2,97 lần. Hoạt động bảo vệ gan của cao lá GT được khảo sát trên chuột tổn thương gan bằng CCl₄ với liều 2,5 ml/kg/ngày bằng đường uống trong thời gian 4 tuần. Silymarin được sử dụng như đối chứng dương. Ở các liều khảo sát cao lá GT 100, 200, 400 mg/kg trọng lượng chuột đều cho hiệu quả làm giảm hàm lượng các enzyme ALT và AST trong huyết thanh rất tốt. Cao lá GT cũng cải thiện được trạng thái stress oxy hóa trong gan qua hiệu quả làm giảm mức MDA và làm tăng mức GSH trong mô gan.

Trích dẫn: Phan Kim Định, Nguyễn Trọng Tuân và Đái Thị Xuân Trang, 2019. Hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết lá gáo trắng (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5A): 24-31.

1 GIỚI THIỆU

Gan là một trong những cơ quan lớn nhất trong cơ thể con người và là nơi tập trung sự trao đổi chất và bài tiết mạnh mẽ (Ahsan *et al.*, 2009). Gan đóng một vai trò quan trọng trong việc giải độc và bài tiết nhiều hợp chất nội sinh và ngoại sinh. Do vậy, gan là nơi có hoạt động trao đổi chất cao và là nơi quan trọng sinh ra các gốc tự do (Arauz *et al.*, 2016). Sự sản xuất các gốc tự do quá mức gây stress oxy hóa trong gan có thể dẫn đến tổn thương gan (Li *et al.*, 2015). Trong hầu hết các trường hợp tổn thương gan được biết là có liên quan đến stress oxy hóa và được đặc trưng bởi sự tiến triển từ gan nhiễm mỡ đến viêm gan, xơ hóa, xơ gan và ung thư tế bào biểu mô gan (Lin *et al.*, 2008). Stress oxy hóa trong gan làm giảm các chất chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GSH) và tăng sự peroxide hóa lipid (LPO) trong gan (Melekh *et al.*, 2017). Sử dụng chất chống oxy hoá 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 *et al.*, 2005). Các hợp chất flavonoids và polyphenol ở nhiều loài thực vật đã được chứng minh có khả năng chống oxy hóa (Srivastava *et al.*, 2014). Việc nghiên cứu phát hiện các loài thực vật có khả năng chống oxy hóa bảo vệ gan được coi là cơ sở của các nghiên cứu tìm ra phương pháp điều trị các bệnh về gan một cách an toàn và hiệu quả.

Cây Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser) là một loài thân gỗ thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) sinh trưởng tốt ở vùng ngập nước, xuất hiện nhiều ở các quốc gia nằm trong đới khí hậu nhiệt đới. Trên thế giới, cây Gáo trắng đã được nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa (Chandel *et al.*, 2012), chống nấm (Patel *et al.*, 2011), hoạt động điều hòa miễn dịch (Khandelwal *et al.*, 2018). Ở Việt Nam, cây Gáo trắng mọc hoang ở nhiều nơi hoặc được trồng để phủ xanh hoặc lấy gỗ, kinh nghiệm chữa bệnh chưa được phổ biến. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát khả năng chống oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết lá Gáo trắng.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện, thiết bị và vật liệu thí nghiệm

Vật liệu thí nghiệm là lá Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser) thu hái ở tỉnh An Giang, được định danh dựa vào hình thái cơ quan thực vật theo Phạm Hoàng Hộ (2003).

Đối tượng thí nghiệm là chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var *Albino*) khỏe mạnh, 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 methanol lá Gáo trắng

Mẫu lá Gáo trắng sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40 – 45 °C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu 2000 gram được cho vào trong túi vải và ngâm dầm trong methanol. Mẫu được ngâm ba lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi dung môi thu được 52,3 gram cao methanol tổng của lá Gáo trắng.

2.2.2 Khảo sát hoạt động chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng

Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH

Khả năng chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng được xác định nhờ 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 µL DPPH ($6 \times 10^{-4} M$) và 200 µL dung dịch mẫu thử là cao methanol lá Gáo trắng ở các nồng độ: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 và 100 µg/mL. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang phổ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định dựa vào giá trị EC₅₀ (Effective concentration of 50%). Giá trị EC₅₀ được tính dựa trên phương trình tuyến tính của cao từng loại cao khảo sát. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C ở các nồng độ khảo sát 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 và 40 µg/mL.

Khảo sát hiệu quả chống oxy hóa của lá Gáo trắng dựa trên hoạt động khử sắt

Hoạt tính chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng được xác định dựa trên khả năng khử Fe³⁺ trong phức Fe(CN)₆³⁻ thành Fe²⁺ trong phức Fe(CN)₆⁴⁻ khi có mặt của chất chống oxy hóa, sau đó phức Fe(CN)₆⁴⁻ tiếp tục phản ứng với Fe³⁺ trong FeCl₃ để tạo thành phức Fe[Fe(CN)₆] có màu xanh được đo ở bước sóng 700 nm. 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 methanol lá Gáo trắng ở các nồng độ khảo sát (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 và 140 µg/mL), 0,5 mL đệm phosphate 0,2 M pH 6,6 và 0,5 mL K₃Fe(CN)₆ 1%. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50 °C trong 20 phút, thêm 0,5 mL CCl₃COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 0,5 mL cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL FeCl₃ 0,1%, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700

nm. Butylated hydroxyanisole (BHA) được sử dụng như chất đối chứng dương và được khảo sát ở các nồng độ 0, 10, 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.3 Xác định hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết lá Gáo trắng

Thành phần hóa học của cao methanol lá Gáo trắng gồm: alkaloids, flavonoids, triterpenoids, glycoside, phenol, tannins, saponins được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Định lượng polyphenol tổng bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo phương pháp của Singleton *et al.* (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μL cao methanol trong 250 μL nước và 250 μL thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 μL Na_2CO_3 10% rồi ủ 30 phút ở 40 $^\circ\text{C}$ trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Acid gallic được sử dụng để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol tổng trong cao methanol lá Gáo trắng được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic.

Phương pháp định lượng flavonoid toàn phần

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 rồi lắc đều. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được thêm vào 200 μL NaNO_2 5%, để yên 5 phút tiếp tục thêm 200 μL AlCl_3 10%, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút được thêm 2 mL NaOH 1M. 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. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao methanol lá Gáo trắng được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.4 Khảo sát khả năng bảo vệ gan của cao chiết lá cây Gáo trắng

Thí nghiệm khảo sát hoạt tính bảo vệ gan của cao methanol lá Gáo trắng được tiến hành theo phương pháp của Kang and Koppula (2014) có hiệu chỉnh. Sử dụng CCl_4 liều 2,5 mL/kg trọng lượng chuột (CCl_4 pha trong dầu olive theo tỉ lệ 1:4) gây nhiễm độc gan và tinh chất silymarin liều 16 mg/kg trọng lượng chuột làm thuốc bảo vệ gan đối chứng. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% được dùng pha cao chiết và silymarin. Cao methanol lá Gáo trắng được khảo sát các liều 100, 200, 400 mg/kg trọng lượng chuột. Chuột khỏe mạnh được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm thí nghiệm, mỗi nhóm gồm 5 con chuột.

Nhóm 1: Chuột uống nước cất

Nhóm 2: Chuột uống 2,5 mL/kg DMSO 1%/lần/ngày

Nhóm 3: Chuột uống 2,5 mL/kg CCl_4 /lần/ngày

Nhóm 4: Chuột uống 2,5 mL/kg CCl_4 /lần/ngày, sau 1 giờ uống 16 mg/kg silymarin/lần/ngày

Nhóm 5: Chuột uống 2,5 mL/kg CCl_4 /lần/ngày, sau 1 giờ uống 100 mg/kg cao lá Gáo trắng/lần/ngày

Nhóm 6: Chuột uống 2,5 mL/kg CCl_4 /lần/ngày, sau 1 giờ uống 200 mg/kg cao lá Gáo trắng/lần/ngày

Nhóm 7: Chuột uống 2,5 mL/kg CCl_4 /lần/ngày, sau 1 giờ uống 400 mg/kg cao lá Gáo trắng/lần/ngày

Kết thúc thí nghiệm, chuột được gây mê giải phẫu lấy máu ở tim để xác định hàm lượng enzyme aspartate transaminase (AST) và alanine aminotransferase (ALT) trong huyết thanh, gan được tách lấy để xác định hàm lượng malondialdehyde (MDA), glutathion (GSH).

Đánh giá sinh hóa

Khả năng bảo vệ gan được đánh giá bằng việc xác định hoạt độ của enzyme ALT, AST trong huyết thanh và hàm lượng MDA và GSH trong gan. 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 malondialdehyde (MDA) và glutathione (GSH) theo phương pháp của Ohkawa *et al.* (1979) và Moron *et al.* (1979) được hiệu chỉnh theo Nguyễn Bảo Trân và *ctv.* (2011). Gan chuột được tách ra khỏi cơ thể và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm KCl 1,15% ở nhiệt độ 4 $^\circ\text{C}$. 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 $^\circ\text{C}$ trong 60 phút. Phản ứng sau khi được kết thúc bằng 0,5 mL acid tricloacetic 10% được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 $^\circ\text{C}$. Phần dịch lỏng sau khi ly tâm được sử dụng để xác định hàm lượng MDA và GSH.

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

Hàm lượng glutathione (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/g) được tính dựa theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn GSH.

2.2.5 *Thông kê phân tích số liệu*

Số liệu được trình bày bằng Mean ± SEM. Kết quả được xử lý thống kê theo phương pháp ANOVA bằng phần mềm Excel và Minitab 16.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

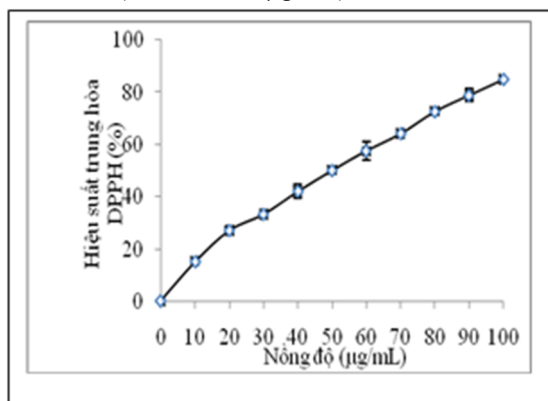
3.1 **Kết quả về khả năng chống oxy hóa của lá Gáo trắng**

Khả năng chống oxy hoá của lá Gáo trắng được khảo sát thông qua hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH và hiệu quả khử sắt của cao chiết.

3.1.1 *Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của lá Gáo trắng*

Hiệu quả chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH được tính dựa trên tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ của DPPH khi có và không có cao methanol lá Gáo trắng (Hình 1). Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, nồng độ cao chiết càng cao thì khả năng trung hòa gốc tự do càng lớn và ngược lại. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH của cao methanol lá Gáo trắng ở nồng độ 100 µg/mL đạt hiệu suất khoảng 80%.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cao chiết lá Gáo trắng được so sánh với hiệu quả trung hòa gốc tự do của vitamin C dựa vào giá trị EC₅₀. Giá trị EC₅₀ của cao chiết được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,8119x + 7,227$ ($R^2 = 0,987$) và giá trị EC₅₀ của vitamin C được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,9846x + 4,1977$ ($R^2 = 0,981$). Kết quả, khả năng chống oxy hóa của lá Gáo trắng (EC₅₀= 52,69 µg/mL) thấp hơn vitamin C (EC₅₀= 46,52 µg/mL) là 1,13 lần.



Hình 1: Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cao lá Gáo trắng

3.1.2 *Khả năng khử sắt của lá Gáo trắng*

Hiệu quả chống oxy hóa của lá Gáo trắng dựa trên khả năng khử sắt được tính tương đương µg/mL BHA dựa vào phương trình đường chuẩn BHA: $y = 0,011x + 0,144$ ($R^2 = 0,993$). Kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Dựa vào kết quả trình bày ở Bảng 1 cho thấy, khả năng khử sắt tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, hàm lượng chất chống oxy hóa trong cao methanol lá Gáo trắng tương đương µg/mL BHA tăng từ 16,26±0,14 µg/mL đến 58,42±0,76 µg/mL tương ứng với nồng độ cao methanol lá Gáo trắng tăng từ 20 µg/mL đến 140 µg/mL.

Bảng 1: Hàm lượng chất chống oxy hóa có trong lá Gáo trắng

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Hàm lượng chất chống oxy hóa tương đương µg/mL BHA
0	-
20	16,26 ^f ±0,14
40	25,64 ^e ±1,64
60	28,35 ^e ±0,026
80	32,81 ^d ±4,02
100	44,92 ^c ±0,65
120	49,79 ^b ±0,56
140	58,42 ^a ±0,76

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. (-) là không xác định.

Hiệu quả chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng theo phương pháp khử sắt ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn BHA bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết (µg/mL) có giá trị OD = 0,5 (OD_{0,5}). Giá trị OD_{0,5} của cao chiết được tính dựa vào phương trình hồi quy của cao chiết ($y = 0,004x + 0,1382$; $R^2 = 0,979$) và của chất chuẩn BHA dựa vào phương trình hồi quy của chất chuẩn ($y = 0,0118x + 0,1448$; $R^2 = 0,993$). Kết quả cho thấy, khả năng chống oxy hóa của cao methanol lá Gáo trắng (OD_{0,5}=89,68 µg/mL) thấp hơn khả năng chống oxy hóa của BHA (OD_{0,5}=30,19 µg/mL) là 2,97 lần.

So với kết quả nghiên cứu của Chandel *et al.* (2012) khả năng chống oxy hóa (làm sạch gốc tự do DPPH) của lá Gáo trắng (EC₅₀= 63,94 µg/mL) thấp hơn rutin (EC₅₀= 54,05 µg/mL) là 1,18 lần; cao chiết methanol lá và thân cây Trang Sơn (cùng họ Cà phê với cây Gáo trắng) lần lượt có giá trị EC₅₀ là 109,95 µg/mL và 272,42 µg/mL (Torey *et al.*, 2010). Từ đây cho thấy, khả năng chống oxy hóa của lá Gáo trắng mặc dù thấp hơn vitamin C và BHA nhưng so với các nghiên cứu khác là cao hơn.

3.1.3 Thành phần polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học có trong cao methanol được chiết từ lá Gáo trắng cho thấy sự có mặt của các thành phần có hoạt tính sinh học khác nhau như: flavonoid, phenol, alkaloid, tannin, triterpenoid, glycoside.

Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) với chất chuẩn là acid gallic trong dãy nồng độ từ 2 đến 10 µg/mL có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,161x + 0,0807$ ($R^2 = 0,9989$). Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) từ chất chuẩn quercetin trong dãy nồng độ từ 20 đến 120 µg/mL với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0087x - 0,0069$ ($R^2 = 0,989$). Trên cơ sở các đường chuẩn này, hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần có trong cao chiết được xác định lần lượt là $376,43 \pm 2,22$ mg GAE/g và $613,53 \pm 90,39$ mg QE/g. So với kết quả nghiên cứu của Ganjewala *et al.* (2013) hàm lượng phenolic tổng và flavonoid toàn phần có trong cao chiết methanol lá cây Gáo trắng (*Neolamarkia cadamba* Roxb.) lần lượt là 48,0 mg GAE/g và 103,3 mg QE/g. Như vậy, hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết lá Gáo trắng được nghiên cứu là khá cao có thể do vị trí địa lý và thổ nhưỡng thuận lợi. Các hợp chất phenol và

flavonoid được chứng minh là có liên quan đến hoạt động chống oxy hóa trong hệ thống sinh học (Chang *et al.*, 2007). Nhiều triterpenoid tự nhiên có hoạt tính chống viêm tốt được phân lập từ nhiều loại cây khác nhau (Fernandez *et al.*, 2001; Ismaili *et al.*, 2002). Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi chứng minh rằng cao methanol được chiết từ lá Gáo trắng có chứa nhiều hợp chất sinh học đầy tiềm năng ứng dụng. Chính vì vậy cao chiết lá Gáo trắng có hoạt tính chống oxy hóa khá tốt như trên.

3.2 Hoạt tính bảo vệ gan của cao chiết lá Gáo trắng

Hoạt tính bảo vệ gan của cao chiết lá Gáo trắng được khảo sát qua hiệu quả bảo vệ gan trên chuột được gây tổn thương gan bằng CCl₄. Hiệu quả bảo vệ gan được đánh giá qua kết quả các chỉ tiêu sinh hóa bao gồm hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh, hàm lượng MDA và GSH trong gan.

Thông qua việc xác định hàm lượng AST và ALT huyết thanh, MDA và GSH trong gan của các nhóm chuột thí nghiệm có thể xác định được mức độ tổn thương của gan cũng như khả năng bảo vệ gan của cao chiết lá Gáo trắng. Các giá trị sinh hóa được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Hàm lượng ALT, AST, MDA và GSH của chuột thí nghiệm

Thí nghiệm	Hàm lượng men gan trong máu (U/L)		Hàm lượng MDA và GSH trong gan (nmol/g)	
	ALT	AST	MDA	GSH
Nước cất	34,40 ^b ±8,91	169,00 ^{bc} ±12,43	1,95 ^c ±0,23	524,10 ^d ±77,30
CCl ₄	921,00 ^a ±375,00	1386,00 ^a ±354,00	16,10 ^a ±2,17	141,39 ^e ±15,80
DMSO 1%	69,80 ^b ±21,30	178,20 ^{bc} ±43,00	2,01 ^c ±0,20	487,20 ^d ±46,00
CCl ₄ , Silymarin 16 mg/kg	113,60 ^b ±26,80	257,60 ^b ±134,50	1,93 ^c ±0,20	928,80 ^c ±38,00
CCl ₄ , lá Gáo Trắng 100 mg/kg	30,00 ^b ±8,34	125,00 ^{bc} ± 29,70	7,88 ^b ±0,68	590,60 ^d ±96,70
CCl ₄ , lá Gáo Trắng 200 mg/kg	28,60 ^b ±6,35	81,40 ^{bc} ±13,05	2,61 ^c ±0,28	1288,90 ^b ±135,50
CCl ₄ , lá Gáo Trắng 400 mg/kg	21,40 ^b ±3,78	57,00 ^c ±15,44	1,58 ^c ±0,19	2191,40 ^a ±185,30

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy hoạt động của các enzyme ALT, AST tăng cao ở nhóm đối chứng bệnh (CCl₄) so với các nhóm đối chứng sinh lý và DMSO 1% ($p < 0,05$), phản ánh sự tổn thương ở mô gan. Các nhóm chuột điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng (100, 200 hoặc 400 mg/kg) và silymarin đã làm giảm hoạt độ của các enzyme này theo hướng về mức bình thường. Hiệu quả làm giảm hoạt độ enzyme phụ thuộc vào liều, ở liều 200 mg/kg có thể so sánh với thuốc chuẩn silymarin (16 mg/kg) và liều 400 mg/kg có thể đưa hoạt độ enzyme về mức bình thường.

Sự thay đổi hàm lượng MDA và GSH trong gan cũng được trình bày trong Bảng 2. Kết quả ở Bảng

2 cho thấy, nhóm chuột đối chứng bệnh có hàm lượng MDA tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê trong khi hàm lượng GSH giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng sinh lý. Sự thay đổi hàm lượng MDA và GSH là do sự stress oxy hóa và peroxide hóa lipid xảy ra mạnh mẽ ở gan. Ở các nhóm chuột điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng (100, 200 hoặc 400 mg/kg) và silymarin đã cải thiện trạng thái stress oxy hóa và peroxide hóa lipid ở gan theo xu hướng làm giảm MDA và làm tăng GSH. Khi điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng ở liều 400 mg/kg, kết quả đạt được tốt hơn silymarin liều 16 mg/kg.

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 CCl_4 làm tăng đáng kể hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh cho thấy gan đã tổn thương (Kandimalla *et al.*, 2016). Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, ở nhóm đối chứng bệnh hàm lượng enzyme gan AST ($1386,40 \pm 354,50$ U/L) và ALT ($921,20 \pm 375$ U/L) cao khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chuột đối chứng sinh lý. Chuột uống CCl_4 kéo dài 4 tuần thì hàm lượng enzyme ALT tăng 26 lần so với chuột bình thường, chúng tỏ chuột uống CCl_4 đã bị tổn thương gan. Hàm lượng enzyme ALT và AST trong huyết thanh cao được làm giảm khi điều trị với silymarin hoặc cao chiết lá Gáo trắng. Hiệu quả bảo vệ gan của silymarin và cao methanol lá Gáo trắng được thể hiện bởi sự giảm nồng độ của hai enzyme gan AST và ALT ở Bảng 2. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, nhóm chuột bệnh được điều trị bằng silymarin có hàm lượng AST và ALT lần lượt đo được trong máu là $257,60 \pm 134,00$ U/L và $113,60 \pm 26,8$ U/L, vẫn còn cao hơn nhóm đối chứng sinh lý nhưng so với nhóm chuột đối chứng bệnh thì silymarin liều 16 mg/kg có hiệu suất làm giảm enzyme AST đạt $92,72 \pm 11,05\%$ và ALT là $91,07 \pm 3,02\%$. Từ đó, có thể thấy liều silymarin 16 mg/kg đã ức chế được tác hại CCl_4 , bảo vệ được gan chuột thí nghiệm. Các nghiên cứu trước đây cho thấy silymarin có khả năng bảo vệ gan khỏi tổn thương do CCl_4 gây ra (Refaey *et al.*, 2015; Duong *et al.*, 2016). Silymarin có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm 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 (Federico *et al.*, 2017). Cao chiết lá Gáo trắng cũng sở hữu hoạt tính chống oxy hóa khá cao nên có khả năng bảo vệ gan. Các nhóm chuột bệnh được điều trị bằng cao methanol lá Gáo trắng ở các nồng độ 100, 200 hoặc 400 mg/kg có mức enzyme AST và ALT trong huyết thanh được cải thiện rõ rệt so với nhóm đối chứng bệnh. Ngay ở nồng độ 100 mg/kg cao methanol lá Gáo trắng đã làm giảm đáng kể hàm lượng enzyme AST ($125,00 \pm 29,70$ U/L) và ALT ($30,00 \pm 8,34$ U/L) huyết thanh, tương đương với nhóm chuột bình thường cũng như nhóm điều trị với silymarin liều 16 mg/kg và khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng bệnh. Ở nồng độ cao chiết 400 mg/kg, hàm lượng AST và ALT lần lượt là $57,00 \pm 15,44$ U/L và $21,40 \pm 3,78$ U/L, tương đương với nhóm đối chứng sinh lý. Cao chiết lá Gáo trắng biểu hiện khả năng làm giảm AST và ALT huyết thanh rất tốt.

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) là nhóm thiol nội bào phổ biến nhất, với nồng độ nội bào từ khoảng 500 đến 10000 nmol. Ở dạng khử, GSH là một chất chống oxy hoá 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

hoá ngoại sinh (Yuan and Kaplowitz, 2009; Enns and Cowan, 2017). Gây tổn thương gan bằng CCl_4 làm giảm GSH trong gan và các chất bảo vệ gan hiệu quả sẽ làm phục hồi hàm lượng GSH trong mô gan (Lu *et al.*, 2017). Qua kết quả nghiên cứu trình bày ở Bảng 2, hàm lượng GSH của nhóm chuột đối chứng bệnh ($141,39 \pm 15,80$ nmol/g) thấp hơn nhóm chuột đối chứng sinh lý ($524,10 \pm 77,30$ nmol/g) là 3,71 lần. Ở nhóm chuột gây bệnh được điều trị bằng silymarin đã phục hồi đáng kể mức GSH trong gan ($928,80 \pm 38$ nmol/g). Các nhóm chuột gây bệnh được điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng có hàm lượng GSH tăng từ $590,60 \pm 96,70$ nmol/g ở nồng độ 100 mg/kg lên $2191,40 \pm 185,30$ nmol/g ở nồng độ 400 mg/kg. Như vậy, ở nồng độ 100 mg/kg cao chiết lá Gáo trắng đã có thể điều hòa lượng GSH tương đương với hàm lượng GSH ở nhóm chuột đối chứng sinh lý. Điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng ở nồng độ 400 mg/kg làm cho hàm lượng GSH tăng cao hơn chuột được cho uống silymarin liều 16 mg/kg là 2,35 lần.

Peroxide hóa lipid là một trong những đặc điểm chính của sự nhiễm độc gan gây ra do CCl_4 . 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). Tác nhân bảo vệ gan hiệu quả sẽ làm giảm được hàm lượng MDA trong mô gan (Tsai *et al.*, 2017). Kết quả nghiên cứu (Bảng 2) cho thấy, nhóm chuột đối chứng bệnh có hàm lượng MDA ($16,10 \pm 2,17$ nmol/g) cao gấp 8,26 lần và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm chuột đối chứng sinh lý ($1,95 \pm 0,23$ nmol/g) hoặc DMSO 1% ($2,01 \pm 0,20$ nmol/g). Sự gia tăng mức MDA ở gan cho thấy sự gia tăng peroxide hóa lipid, do đó dẫn đến tổn thương gan cũng như sự hoạt động kém hiệu quả của hệ thống bảo vệ chống oxy hóa. Tuy nhiên, mức MDA tăng được làm giảm sau khi điều trị bằng silymarin hoặc cao chiết lá Gáo trắng. Hàm lượng MDA ở nhóm chuột tổn thương gan được điều trị bằng lá Gáo trắng giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê khi tăng nồng độ cao chiết. Ở các nhóm chuột điều trị bằng cao chiết lá Gáo trắng ở nồng độ 100, 200 và 400 mg/kg có hàm lượng MDA lần lượt giảm 2 ; 6 và 10 lần so với nhóm đối chứng bệnh. Hiệu quả giảm hàm lượng MDA của cao chiết lá Gáo trắng ở nồng độ 400 mg/kg ($1,58 \pm 0,19$ nmol/g) tương tự silymarin liều 16 mg/kg ($1,93 \pm 0,20$ nmol/g). Từ các kết quả phân tích hàm lượng enzyme gan ALT và AST huyết thanh cũng như MDA và GSH trong mô gan của các nhóm chuột thí nghiệm cho thấy, ở nồng độ 400 mg/kg cao chiết lá Gáo trắng thể hiện hiệu quả bảo vệ gan tương tự thuốc tiêu chuẩn silymarin liều 16 mg/kg, chứng tỏ

được tiềm năng của cao chiết lá Gáo trắng trong bảo vệ gan.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này đã chứng minh rằng cao methanol lá Gáo trắng có khả năng chống oxy hóa và bảo vệ gan. Kết quả phân tích hai thành phần được chứng minh có khả năng chống oxy hóa là polyphenol và flavonoid ở lá Gáo trắng khá cao. Ở các nồng độ được khảo sát, cao methanol lá Gáo trắng đều cho thấy khả năng làm giảm hàm lượng enzyme ALT và AST huyết thanh rất hiệu quả. Bên cạnh đó, cao lá Gáo trắng 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.

LỜI CẢM Ạ

Bài báo được hỗ trợ một phần từ kinh phí đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường của Trường Đại học Cần Thơ. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí thực hiện đề tài mã số T2018-6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahsan, R., Islam, M., Bulbul, J.I., Musaddik, A., and Haque, E., 2009. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *European Journal of Scientific Research*. 37(2): 302–310.

Arauz, J., Ramos-Tovar, E., and Muriel, P., 2016. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*. 15(2): 160-173.

Bag, G.C., Devi, P.G., and Bhaigiyabati, T., 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur Valley. *International Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 30(1) 28: 154-159.

Chandel, M., Sharma, U., Kumar, N., Singh, B., and Kaur, S., 2012. Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of *Anthocephalus cadamba* by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5(12): 977-985.

Chang, H.C., Huang, G.J., Agrawal, D.C., Kuo, C.L., Wu, C.R., and Tsay, H.S., 2007. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as “Gusuibu”. *Botanical Studies*. 48(4): 397–406.

Duong, T.P.L., Cao, T.K.H., Nguyen, T.H., Duong, X.C., Phan, T.B.T., and Ha, 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., and 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., and Loguercio, C., 2017. Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*. 22(2): 191.

Fernández, M.A., de las Heras, B., Garcia, M.D., Sáenz, M.T., and Villar, A., 2001. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeole. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53(11): 1533–1539.

Ganjewala, D., Tomar, N., and Gupta, A.K., 2013. Phytochemical composition and antioxidant properties of methanol extracts of leaves and fruits of *Neolamarckia cadamba* (Roxb.). *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 3(4): 232-240.

Ismaili, H., Sosa, S., Brkic, D. *et al.*, 2002. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54(8): 1137–1140.

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., and 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.

Khandelwal, V., Choudhary, P.K., Goel, A. *et al.*, 2018. Immunomodulatory activity of *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser with reference to IL-2 induction. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 17(3): 451-459.

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.

Lin, C.S., Chang, C.S., Yang, S.S., Yeh, H.Z., and Lin, C.W., 2008. Retrospective evaluation of serum markers APRI and AST/ALT for assessing liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B and C patients with hepatocellular carcinoma. *Internal Medicine*. 47(7): 569-575.

Lu, Y., Chen, J., Ren, D., Yang, X., and Zhao, Y., 2017. Hepatoprotective effects of phloretin against CCl₄-induced liver injury in mice. *Food and Agricultural Immunology*. 28(2): 211-222.

Medina, J., and Moreno-Otero, R., 2005. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*. 65(17): 2445-2461.

Melekh, B., Ilkiv, I., Lozynskyi, A., and Sklyarov, A., 2017. Antioxidant enzyme activity and lipid

- peroxidation in rat liver exposed to celecoxib and lansoprazole under epinephrine-induced stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 7(10): 094-099.
- Moron, M., Depierre, J.W., and Mannervik, B., 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione s-transferase activity in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 582(1): 67-78.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh. 7-79.
- Nguyễn Bảo Trân, Trần Quang Vinh và Nguyễn Ngọc Khôi, 2011. Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của lá cây Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam. Moringaceae). *Tạp Chí Dược Học*. Số 421 năm 51: 25-28.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95(2): 351-358.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44(6): 307-315.
- Patel, D.A., Darji, V.C., Bariya, A.H., Patel, K.R., and Sonpal, R.N., 2011. Evaluation of antifungal activity of *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser leaf and bark extract. *International Research Journal of Pharmacy* 2(5): 192-193.
- Phạm Hoàng Hộ, 2003. Cây Cỏ Việt Nam (Q. III). Nhà xuất bản Trẻ. Thành phố Hồ Chí Minh. 137-144
- Prakash, A., Rigelhof, F., and Miller, E., 2000. Antioxidant activity. *Analytical progress Medallion Laboratories*. 19(2): 1-4.
- Refaey, M.S., Mustafa, M.A.H., Mohamed, A.M., and 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.
- Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., and Mitcheva, M., 2014. Review Article: 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. (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/706302>)
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*. 299: 152-78.
- Srivastava, S., and Choudhary, G.P., 2014. Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1): 194-197.
- Torey A., Sasidharan, S., Latha, L.Y., Sudhakaran, S., and Ramanathan, S., 2010. Antioxidant activity and total phenolic content of methanol extracts of *Ixora coccinea*. *Pharmaceutical Biology*. 48(10): 1119-1123.
- Tsai, J.C., Chiu, C.S., Chen, Y.C. *et al.*, 2017. Hepatoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* flowers against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17(1): 139.
- Yuan, L., and Kaplowitz, N., 2009. Review Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine*. 30(1-2): 29-41.