

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA *IN VITRO* CAO CHIẾT RAU NGŨ (*Enhydra fluctuans* Lour., Asteraceae) TRÊN HAI THỬ NGHIỆM DPPH VÀ MDA

• Huỳnh Anh Duy^(*), Lâm Thị Ngọc Giàu^(**), Bùi Mỹ Linh^(***)

Tóm tắt

Rau ngổ được dùng nhiều trong y học dân gian, nhưng có ít nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài cây này. Trong bài báo này, cao chiết cồn 40% của Rau ngổ bước đầu được khảo sát tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên hai mô hình thử nghiệm DPPH và MDA, thu được các giá trị IC_{50} lần lượt là 1706,52 $\mu\text{g/ml}$ và 1081,17 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả cho thấy, loài cây này là nguyên liệu tiềm năng trong việc sử dụng làm thuốc chống oxy hóa, định hướng tác dụng bảo vệ gan.

Từ khóa: Rau ngổ, hoạt tính chống oxy hóa, thử nghiệm DPPH, thử nghiệm MDA.

1. Đặt vấn đề

Theo y học dân gian, cây Rau ngổ được sử dụng với nhiều công dụng trị bệnh như các trường hợp ăn uống không tiêu, băng huyết, thổ huyết, hỗ trợ gan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát hoạt tính chống oxy hóa hướng tác dụng bảo vệ gan vì đây là công dụng nổi bật của dược liệu thường được người dân sử dụng.

Nghiên cứu bước đầu khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* cao chiết Rau ngổ trên 2 thử nghiệm để xác định khả năng dập tắt gốc tự do (thử nghiệm DPPH) và khả năng ức chế peroxy hóa lipid (thử nghiệm MDA).



Hình 1. Cây Rau ngổ

2. Nguyên liệu, hoá chất và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Cây Rau ngổ thu hái tại xã Hưng Hội, Vĩnh Lợi, Bạc Liêu vào tháng 12/2013. Mẫu được định danh theo tài liệu tham khảo [1]. Sau đó, mẫu được phơi khô, xay thô dùng cho quá trình

nghiên cứu, được lưu tại Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Hóa chất

Acid ascorbic (Merck, Đức), silymarin (Sigma Co.Ltd, Mỹ), trolox (Calbiochem Ltd. Co, Mỹ), đệm phosphat (pH=7,2), natri clorid 0,9%, acid thiobarbituric (TBA) (Nacalai Tesque, Nhật), đệm tris-HCl (Merck, Đức), malonyl dialdehyd (MDA) (Merck, Đức), acid tricloacetic (Trung Quốc), DPPH (Sigma Aldrich).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dịch chiết

Bột thô dược liệu được tiến hành ngâm kiệt với cồn 40% theo tỉ lệ 1:10, dịch chiết được cô cách thủy đến cao đặc. Cao đặc dùng để tiến hành các thử nghiệm chống oxy hóa *in vitro*. Các thử nghiệm được tiến hành tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh.

Thử nghiệm xác định khả năng dập tắt gốc tự do (thử nghiệm DPPH) [2], [4]

Nguyên tắc

Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa theo cơ chế dập tắt gốc tự do sẽ làm giảm màu của 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Xác định khả năng này bằng cách đo quang ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại tại $\lambda=515\text{ nm}$.

Phương pháp

Lấy 0,5 ml mẫu thử ở các nồng độ khảo sát được cho phản ứng với đồng lượng dung dịch DPPH 0,8 mM pha trong MeOH. Hỗn hợp sau khi pha được để trong tối và ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đo quang ở bước sóng $\lambda=515\text{ nm}$. Acid

(*) Trường Đại học Cần Thơ.

(**) Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu.

(***) Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

ascorbic (Merck, Germany) được sử dụng làm chất đối chiếu.

Thử nghiệm xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid (thử nghiệm MDA) [3], [4]

Nguyên tắc

Xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA). MDA là sản phẩm được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, khi cho phản ứng với acid thiobarbituric, một phân tử MDA phản ứng với hai phân tử acid thiobarbituric tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng $\lambda=532$ nm. Đo cường độ màu của phức hợp suy ra hàm lượng MDA có trong mẫu. Phản ứng này thực hiện trong môi trường pH 2-3, ở nhiệt độ 100°C trong vòng 15 phút.

Phương pháp

Lấy 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ thử nghiệm được cho phản ứng với 0,5 ml dịch đồng thể não và thêm đệm phosphat 50 mM vừa đủ 2 ml. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 15 phút và dừng phản ứng bằng 1 ml acid tricloacetic 10%. Sau khi ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% trong 15 phút ở nhiệt độ 100°C. Làm lạnh và tiến hành đo quang ở bước sóng $\lambda=532$ nm. Trolox được sử dụng làm chất đối chiếu.

Tính toán kết quả

Phần trăm % hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) được tính theo công thức

$$HTCO(\%) = \frac{[(ODc - ODt)]}{ODc} \times 100$$

ODc: Mật độ quang của mẫu đối chứng (dung môi).

ODt: Mật độ quang của mẫu thử.

Cách tính giá trị IC_{50}

Vẽ đồ thị biểu diễn tỷ lệ % khả năng dập tắt gốc tự do theo nồng độ khảo sát của chất cần thử nghiệm bằng phần mềm Excel. Từ đồ thị, nội suy ra giá trị nồng độ dập tắt gốc tự do hay ức chế peroxy hóa lipid IC_{50} bằng phương trình hồi quy tuyến tính có dạng $y = ax + b$ và thế $y = 50$ vào để suy ra IC_{50} .

Các số liệu kết quả thử nghiệm được biểu thị bằng trị số trung bình của 3 lần đo.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chuẩn bị cao thử nghiệm

Tiến hành theo quy trình, từ 1640 g bột dược liệu Rau ngổ thu được 433,8 g cao đặc với hiệu suất chiết là 26,4% và độ ẩm cao là 14,8%.

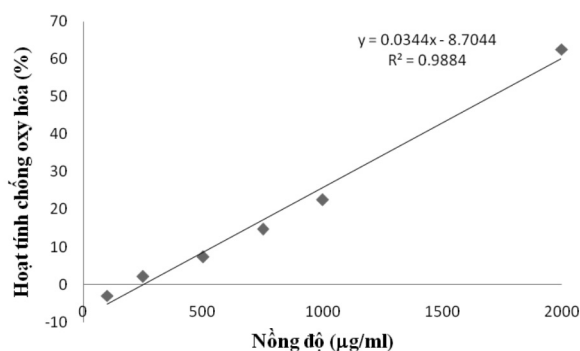
3.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

3.2.1. Thử nghiệm DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa trên mô hình dập tắt gốc tự do DPPH của cao chiết Rau ngổ và chất đối chiếu acid ascorbic được trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao Rau ngổ bằng thử nghiệm DPPH

Nồng độ (µg/ml)	OD (Trung bình)	% HTCO
Đối chứng	0,7560	
2000	0,2830	62,57
1000	0,5855	22,55
750	0,6450	14,68
500	0,7005	7,34
250	0,7405	2,05
100	0,7790	-3,04



Hình 2. Đồ thị tương quan giữa nồng độ và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết Rau ngổ trên thử nghiệm DPPH

Nhận xét

Trong thử nghiệm DPPH, DPPH có màu tím nhờ vào điện tử N chưa ghép đôi, nhưng sau khi phản ứng với oxy nguyên tử của chất dập tắt gốc tự do sẽ bị giảm màu tím. Hoạt tính chống oxy

hóa của cao Rau ngổ thể hiện ở việc làm giảm màu DPPH dẫn đến giảm độ hấp thu ở bước sóng 515 nm. Bảng 1 cho thấy hoạt tính chất oxy hóa của cao Rau ngổ tăng theo nồng độ khảo sát và đạt hoạt tính chống oxy hóa cao nhất ở nồng độ 2000 µg/ml là 62,57%.

Tính toán kết quả:

+ Phương trình hồi qui tuyến tính của acid ascorbic: $y = 0,9638x + 7,593$ ($R^2 = 0,9812$).

+ Phương trình hồi qui tuyến tính của cao Rau ngổ: $y = 0,0344x - 8,7044$ ($R^2 = 0,9884$).

Bảng 2. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của chất đối chiếu acid ascorbic bằng thử nghiệm DPPH

Nồng độ (mM)	Nồng độ (µg/ml)	OD (Trung bình)	% HTCO
Đối chứng		0,913	
1	176,13	0,038	95,89
0,5	88,065	0,053	94,19
0,25	44,032	0,358	60,84
0,1	17,613	0,655	28,31
0,05	8,806	0,760	16,76
0,01	1,761	0,862	5,59

Giá trị IC_{50} được tính bằng phương trình hồi qui tuyến tính sử dụng phần mềm Excel.

+ Giá trị IC_{50} của acid ascorbic là: $IC_{50} = 44$ µg/ml.

+ Giá trị IC_{50} của cao Rau ngổ là : $IC_{50} = 1706,52$ µg/ml.

3.3. Thử nghiệm MDA

Hoạt tính chống oxy hóa trên phương pháp xác định sản phẩm quá trình peroxy hóa lipid của cao Rau ngổ và chất đối chiếu trolox được trình bày ở Bảng 3 và Bảng 4.

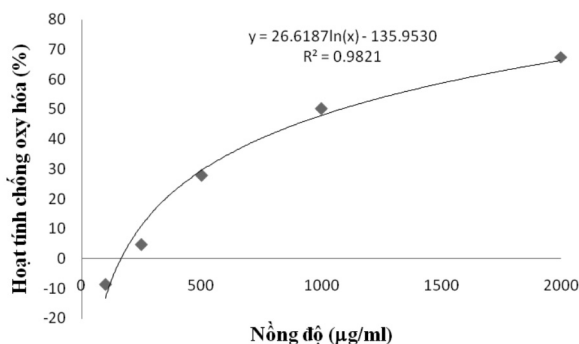
Nhận xét

Trong thử nghiệm này, MDA là chất được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, khi phản ứng với thuốc thử acid thiobarbituric tạo ra phức hợp có màu hồng. Hoạt tính chống oxy hóa của cao Rau ngổ thể hiện qua việc làm giảm màu của phức hợp này do làm giảm lượng MDA có trong mẫu dẫn đến làm giảm độ hấp thu ở bước sóng 532 nm. Bảng 3 cho thấy khả năng chống oxy hóa của cao chiết Rau ngổ ở nồng độ

2000 µg/ml là 67,47%.

Bảng 3. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao Rau ngổ bằng thử nghiệm MDA

Nồng độ (µg/ml)	OD (Trung bình)	HTCO%
Đối chứng	0,332	
2000	0,108	67,47
1000	0,166	50,15
500	0,240	27,86
250	0,317	4,67
100	0,361	-8,73



Hình 3. Đồ thị tương quan giữa nồng độ và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết Rau ngổ trên thử nghiệm MDA

Bảng 4. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của thuốc đối chiếu trolox bằng thử nghiệm MDA

Nồng độ (mM)	OD (Trung bình)	HTCO%
10	0,124	77,70
5	0,203	63,49
1	0,376	32,37
0,5	0,445	19,96
0,1	0,529	4,86

Tính toán kết quả:

+ Phương trình logarithm tuyến tính chất đối chiếu trolox:

$y = 16,267\ln(x) + 36,695$ ($R^2 = 0,9746$).

+ Phương trình logarithm tuyến tính của cao Rau ngổ:

$y = 26,6187\ln(x) - 135,9530$ ($R^2 = 0,9821$).

Giá trị IC_{50} được tính bằng phương trình phân tích hồi qui tuyến tính của đường cong đáp ứng liều tương ứng, sử dụng phần mềm Excel.

+ Giá trị IC_{50} của trolox là $IC_{50} = 562,72$ $\mu\text{g/ml}$.

+ Giá trị IC_{50} của cao Rau ngổ là $IC_{50} = 1081,17$ $\mu\text{g/ml}$.

4. Kết luận

Nghiên cứu bước đầu sàng lọc hoạt tính oxy hóa *in vitro* cao cồn 40% Rau ngổ trên hai mô hình thử nghiệm cho giá trị IC_{50} lần lượt là 1706,52 $\mu\text{g/ml}$ (thử nghiệm DPPH) và 1081,17 $\mu\text{g/ml}$ (thử nghiệm MDA).

Kết quả cho thấy Rau ngổ có hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* mặc dù thấp hơn so với hai chất đối chiếu là acid ascorbic và trolox. Tuy nhiên, đây là một loại rau ăn nên Rau ngổ vẫn có khả năng góp phần bổ sung những chất chống oxy hóa cho cơ thể. Ngoài ra, nghiên cứu này bước đầu định hướng cho những khảo sát tiếp theo về Rau ngổ trên những mô hình khác, góp phần chứng minh tác dụng dược lý của dược liệu này. /.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam - tập 2*, NXB Y học, Hà Nội.
- [2]. Pramod, K. S. et al. (2012), "Antioxidant activity of *Enhydra fluctuans* Lour. aerial parts", *Journal of Phytotherapy and Pharmacology*, 1 (2), p. 23-34.
- [3]. Stroev, E. A. & Makarova, V. G. (1989), *Determination of lipid peroxidation rate in tissue homogenate laboratory*, Manual in Biochemistry, Moscow, p. 243-256.
- [4]. Viện Dược Liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

INVESTIGATING *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Enhydra fluctuans* Lour. EXTRACT VIA DPPH AND MDA ASSAY

Summary

Enhydra fluctuans Lour. is widely used in folk medicine, but there is still little research found on its biological effects. In this paper, the *in vitro* antioxidant activity with 40% ethanol extract from *Enhydra fluctuans* Lour. is determined by DPPH and MDA assay. The IC_{50} values are 1706.52 $\mu\text{g/ml}$ and 1081.17 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results show that *Enhydra fluctuans* Lour. is the potential to be used as an antioxidant and hepatoprotective bioactive-guided medicine.

Keywords: *Enhydra fluctuans* Lour., antioxidant activity, DPPH assay, MDA assay.

Ngày nhận bài: 10/11/2016; Ngày nhận lại: 20/12/2016; Ngày duyệt đăng: 27/01/2017.