

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA *IN VITRO* VÀ BẢO VỆ GAN CỦA THÂN CÂY MẬT GẤU NAM (*Vernonia amygdalina*)

Thái Thị Cẩm¹, Phạm Văn Vĩ¹, Nguyễn Duy Tuấn²,
Nguyễn Thị Mỹ Hạnh³, Nguyễn Thị Linh Em³, Trần Quang Đức⁴

Tóm tắt: Mật gấu nam (*Vernonia amygdalina*) là cây thuốc được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền, tuy nhiên có rất ít nghiên cứu về tác dụng sinh học của nó. Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa dựa trên phương pháp DPPH của các phân đoạn chiết bao gồm dịch chiết cloroform, dịch chiết etyl axetat, dịch chiết n-butanol, dịch chiết etanol và dịch chiết nước đã được nghiên cứu. Trên mô hình DPPH giá trị EC₅₀ thể hiện tốt nhất trên cao ethyl acetate và n-butanol, với EC₅₀ lần lượt là 63,73μg/ml và 87,21μg/ml. Hoạt tính ức chế peroxyl hóa tế bào của chiết xuất từ thân cây *Vernonia amygdalina* cao hơn 4,79 lần so với Trolox. Mật gấu nam là một dược liệu có tiềm năng về khả năng chống oxy hóa và hoạt tính sinh học bảo vệ gan.

Từ khóa: Mật gấu nam, kháng oxi hóa, DPPH, bảo vệ gan.

Abstract: *Vernonia amygdalina* is a medicinal plant widely used in traditional medicine, however there are few researches studied for its biological effects. Herein, DPPH method based antioxidant activities of stem fractions including chloroform extract, ethyl acetate extract, n-butanol extract, ethanol extract, and water extract were investigated. On the DPPH model with the best EC₅₀ values of ethyl acetate and n-butanol extracts, the EC₅₀ values were 63.73μg/ml and 87.21μg/ml respectively. The cell peroxidation inhibitory activity of *Vernonia amygdalina* stem extract was 4.79 times higher than that of Trolox. *Vernonia amygdalina* is a plant with the potential for antioxidant capacity and hepatoprotective bioactivity.

Keywords: *Vernonia amygdalina*, antioxidant, DPPH, hepatoprotective bioactivity.

1. Đặt vấn đề:

Diễn biến bệnh tật trên thế giới và Việt Nam ngày càng phức tạp, phổ biến là các bệnh về gan như: tăng men gan, viêm gan, ung thư gan... 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.

¹ Thạc sĩ - giảng viên khoa Dược, trường đại học Nam Cần Thơ

² Thạc sĩ - giảng viên khoa Y, trường đại học Nam Cần Thơ

³ Giảng viên khoa Dược, trường đại học Nam Cần Thơ

⁴ Tiến sĩ - giảng viên khoa Khoa Học Tự Nhiên, trường đại học Cần Thơ

Mật gấu nam là một loại thảo dược được trồng rất phổ biến ở Việt Nam và được người dân sử dụng để chữa các bệnh như: men gan cao, tăng huyết áp, tiểu đường, tăng lipid máu. Các nghiên cứu đã cho thấy Mật gấu nam có tác dụng chống oxy hóa [3], [6]. Các bộ phận trên mặt đất của cây mật gấu nam chủ yếu được sử dụng như một thuốc hạ sốt, nhuận tràng, chống sốt rét và trị giun [1], [5], [6], [7], ức chế sự tăng trưởng và tăng sinh tế bào ung thư vú [8]. Nghiên cứu này bước đầu khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và tác dụng bảo vệ gan của thân cây Mật gấu nam (*Vernonia amygdalina*) ở Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Cây Mật gấu nam được thu hái vào tháng 09 năm 2020, tại huyện Phong Điền, Thành phố Cần Thơ. Mẫu Mật gấu nam đã được phân tích đặc điểm thực vật, vi phẫu và so sánh trùng khớp với tài liệu của Saliu (2011) [7], mẫu được lưu tại Bộ môn Dược liệu - Trường ĐH Nam Cần Thơ.

Hóa chất: DPPH (2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl), acid gallic, acid thiobarbituric, Trolox (Calbiochem Ltd. Co.) và một số hóa chất khác.

Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát sơ bộ thành phần hóa học có trong cao chiết ethanol 96% thân cây Mật gấu nam.
- Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa.

Chuẩn bị mẫu thử

3,7 kg dược liệu khô thân cây Mật gấu nam chiết ngấm kiệt với ethanol 96%, cô cách thủy loại bớt dung môi thu được 250 gam cao ethanol, tiếp tục chiết phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần, cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chloroform, cao ethyl acetate, cao *n*-butanol và cao nước.

Thử nghiệm xác định khả năng dập tắt gốc tự do (thử nghiệm DPPH)

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết được xác định bởi khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH theo mô tả của Sharma and Bhat (2009) có hiệu chỉnh. Khi có sự hiện diện của chất chống oxy hóa thì các điện tử tự do của DPPH có khả năng kết hợp với hydrogen của chất kháng oxy hóa tạo thành dạng DPPH-H có màu vàng. Giá trị EC₅₀ càng thấp chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do DPPH càng cao và khả năng kháng oxy hóa càng mạnh.

Hỗn hợp phản ứng gồm 100 μ L DPPH và 100 μ L cao chiết (chất chuẩn) đã pha loãng với dãy nồng độ khảo sát. Sau đó, hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút. Đo độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng dương được sử dụng là acid gallic. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phần trăm loại bỏ gốc tự do DPPH được tính theo công thức:

$$\% \text{ Loại bỏ gốc tự do} = (\text{Ac} - \text{Am}) / \text{Ac} \times 100$$

Trong đó:

Ac: là giá trị hấp thụ của đối chứng âm.

Am: là giá trị hấp thụ của mẫu.

Khảo sát hoạt tính bảo vệ gan của thân Mật gấu nam bằng phương pháp peroxy hóa lipid tế bào não chuột

Xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào. MDA có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thụ cực đại ở $\lambda = 532 \text{ nm}$ [2], [4].

Cho mẫu thử ở các nồng độ thử nghiệm phản ứng với dịch đồng thể não, thêm đệm phosphat vừa đủ 2 ml. Ủ hỗn hợp phản ứng trong 15 phút, dừng phản ứng bằng acid trichloroacetic. Sau khi ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với thuốc thử acid thiobarbituric trong 15 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 532 nm. Trolox (Calbiochem Ltd. Co.) được sử dụng làm chất đối chiếu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

Đánh giá kết quả: $\text{HTCO\%} (\% \text{ hoạt tính chống oxy hóa}) = [(\text{OD}_C - \text{OD}_T) / \text{OD}_C] \times 100$

OD_C : Mật độ quang của chứng dung môi (DMSO).

OD_T : Mật độ quang của mẫu thử.

3. Kết quả và bàn luận

- Phân tích thành phần hóa thực vật cao chiết ethanol 96% thân cây Mật gấu nam bằng các phản ứng đặc hiệu có sự hiện diện các nhóm hợp chất như: alkaloid; flavonoid; tanin; saponin; acid hữu cơ và các chất khử.

- Các cao chiết thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của thân cây Mật gấu nam

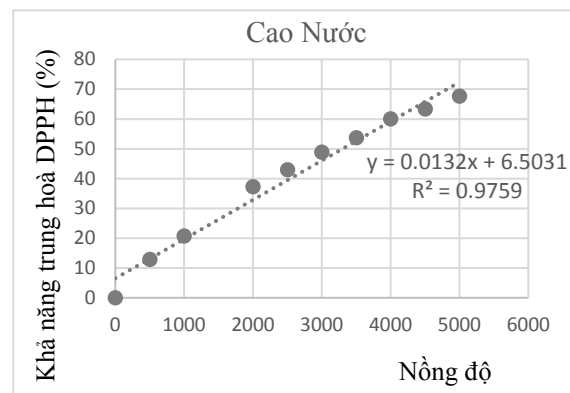
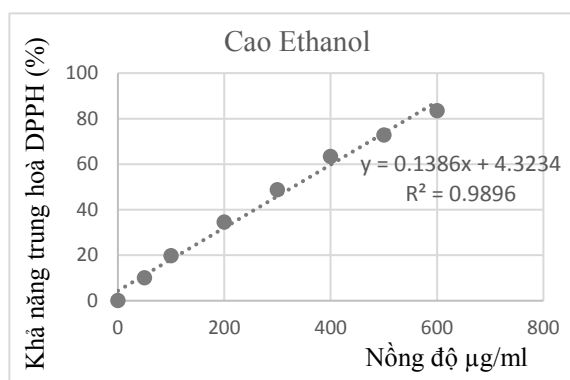
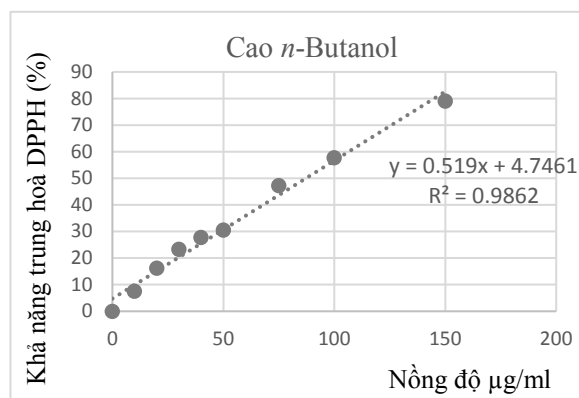
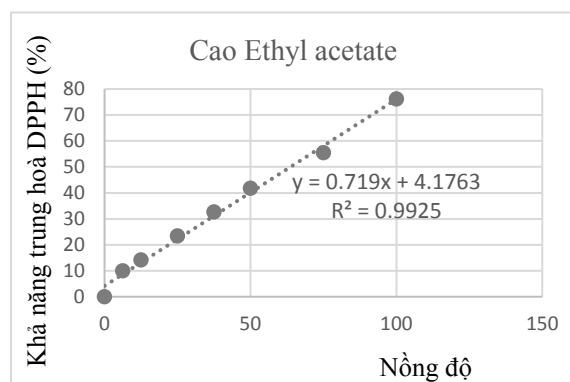
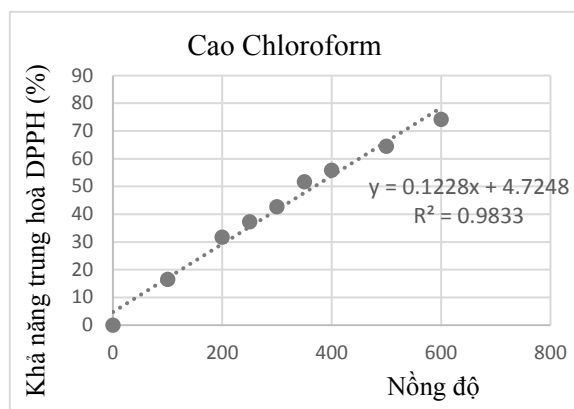
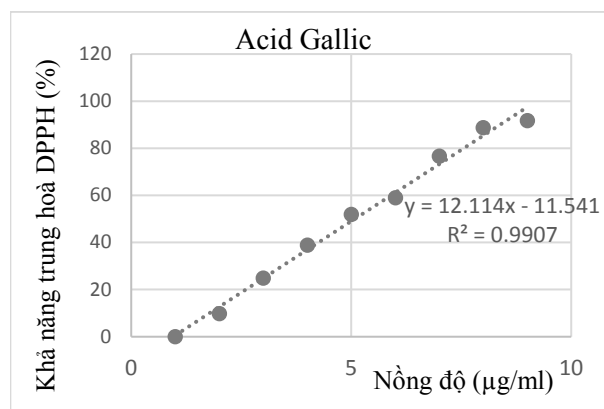
Tất cả các cao phân đoạn thân Mật gấu nam đều có tác dụng chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH ở các nồng độ thử nghiệm. Tuy nhiên, cao chiết ethyl acetate có hoạt động mạnh trung hoà DPPH mạnh hơn so với các cao chiết còn lại. Hoạt động thu gom gốc tự do của tất cả các mẫu cho thấy xu hướng phản ứng phụ thuộc vào nồng độ (Hình 1). Việc tăng nồng độ của các mẫu thử nghiệm sẽ làm tăng tác dụng trung hoà DPPH. Giá trị EC_{50} của các cao chiết chloroform; ethyl acetate; *n*-butanol; ethanol; nước thể hiện Bảng 1.

Trong cao chiết ethyl acetate và *n*-butanol chứa các chất có khả năng trung hoà DPPH mạnh hơn các cao chiết còn lại. Cao có khả năng trung hoà DPPH thấp nhất là cao nước.

Bảng 1. Kết quả hoạt tính chống oxy hóa các cao phân đoạn của thân Mật gấu nam bằng phương pháp DPPH.

Cao chiết	Phương trình hồi quy	R^2	Giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Acid gallic	$y = 12,114x + 0,5733$	0,99	$4,08 \pm 0,01$
Cao Chloroform	$y = 0,1228x + 4,7248$	0,98	$368,35 \pm 0,30$
Cao Ethyl acetate	$y = 0,719x + 4,1763$	0,99	$63,73 \pm 0,49$
Cao <i>n</i> -Butanol	$y = 0,519x + 4,7461$	0,98	$87,21 \pm 1,80$

Cao chiết	Phương trình hồi quy	R ²	Giá trị EC ₅₀ (µg/ml)
Cao ethanol	$y = 0,1386x + 4,3234$	0,98	329,56±1,61
Cao Nước	$y = 0,0132x + 6.5031$	0,97	3303,51±15,60



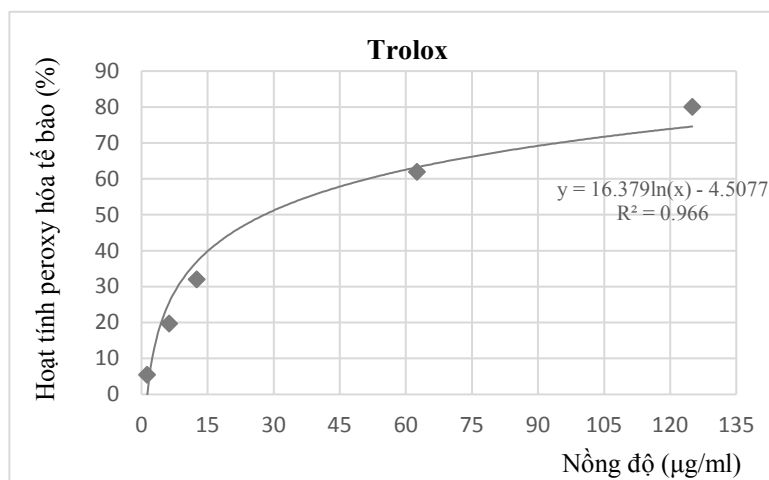
Hình 1. Biểu đồ thể hiện khả năng trung hoà DPPH các cao phân đoạn thân Mật gấu nam.

Hiệu quả bảo vệ gan của cao ethanol thân Mật gấu nam bằng phương pháp peroxy hóa lipid tế bào não chuột

Kết quả thử nghiệm hoạt tính peroxy hóa tế bào của cao ethanol thân Mật gấu nam thể hiện Bảng 2 và Bảng 3:

Bảng 2. Kết quả ức chế peroxy hóa lipid tế bào của Trolox.

Nồng độ ban đầu (µg/ml)	Nồng độ phản ứng (µg/ml)	OD				% HTCO
		L1	L2	L3	TB	
Chứng		0,482	0,481	0,479	0,481	
2500	125,00	0,100	0,089	0,099	0,096	80,03
1250	62,50	0,189	0,179	0,180	0,183	62,00
250	12,50	0,333	0,339	0,308	0,327	32,04
125	6,25	0,394	0,388	0,375	0,386	19,76
25	1,25	0,460	0,458	0,445	0,454	5,48

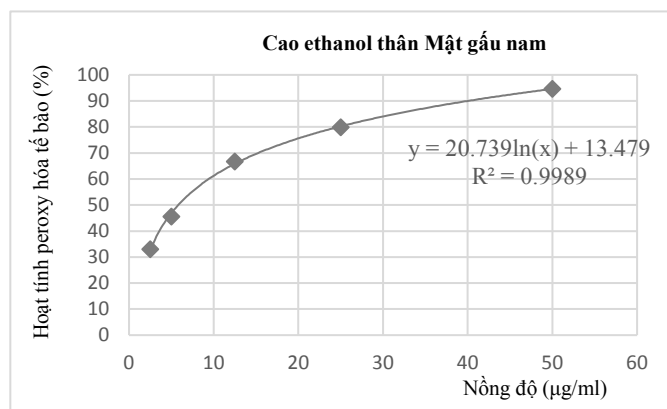


Hình 2. Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid tế bào não chuột của Trolox

Từ bảng 2 xây dựng được phương trình tuyến tính $y = 16,379 \ln(x) - 4,5077$; $r^2 = 0,966$; suy ra $IC_{50} = 27,88$ (µg/ml).

Bảng 3. Kết quả ức chế peroxy hóa lipid tế bào của cao ethanol thân Mật gấu nam.

Nồng độ ban đầu (µg/ml)	Nồng độ phản ứng (µg/ml)	OD				% HTCO
		L1	L2	L3	TB	
Chúng		0,397	0,398	0,398	0,398	
1000	50,00	0,030	0,012	0,022	0,021	94,64
500	25,00	0,098	0,06	0,081	0,080	79,97
250	12,50	0,145	0,119	0,133	0,132	66,72
100	5,00	0,208	0,216	0,225	0,216	45,60
50	2,50	0,281	0,255	0,262	0,266	33,11

**Hình 3.** Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid tế bào của cao thân Mật gấu nam

Kết quả cho thấy cao ethanol thân cây Mật gấu nam có tác dụng bảo vệ gan *in vitro* tốt.

Từ bảng 3 xây dựng được phương trình tuyến tính $y=20,737\ln(x)+13,481$; $r^2=0,9989$; suy ra $IC_{50}=5,82$ (µg/ml).

Kết quả thử nghiệm cho thấy cao ethanol thân cây Mật gấu nam có tác dụng bảo vệ gan *in vitro* tốt. Cao ethanol thân Mật gấu nam thể hiện hoạt tính peroxy hóa tế bào gan cao hơn chứng dương Trolox, hoạt tính peroxy hóa tế bào của Trolox đạt 5,48% tại nồng độ 25 µg/ml và 80,03% ở 2500 µg/ml (Bảng 2). Giá trị IC_{50} của cao chiết thân Mật gấu nam là 5,82 µg/ml so với đối chứng dương Trolox $IC_{50}=27,88$ µg/ml. Hoạt tính ức chế peroxy hóa tế bào của cao chiết thân Mật gấu nam cao hơn Trolox 4,79 lần.

4. Kết luận

Nghiên cứu bước đầu sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* cao ethanol thân cây Mật gấu nam thu hái tại huyện Phong Điền, Thành phố Cần Thơ trên mô hình thử nghiệm DPPH cho giá trị $IC_{50}=329,56$ µg/ml.

Hoạt tính ức chế peroxy hóa tế bào của cao chiết thân Mật gấu nam ($IC_{50} = 5,82 \mu\text{g/ml}$) cao hơn Trolox ($IC_{50} = 27,88 \mu\text{g/ml}$) là 4,79 lần.

Kết quả này cho thấy Mật gấu nam có hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và bảo vệ gan tốt, góp phần bổ sung những chất chống oxy hóa cho cơ thể. Nghiên cứu này bước đầu định hướng cho những khảo sát tiếp theo về Mật gấu nam trên những mô hình khác, góp phần chứng minh tác dụng dược lý của dược liệu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Agra M.F., Silva K.N., Diniz I.J.L., Freitas P.F., Barbosa-Filho J.M., (2008), “Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil”, *Rev. Bras. Farmacogn*, v18(n3), p.472-508.
- [2] Cheseman K.H. (1985), Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues, *J. Biol. Chem.*, V.235, pp. 507-514.
- [3] Farombi E.O., Owuoye O., (2011), “Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v8(n6), p.2533-2555.
- [4] Franco E., Meleleo C., Serino L., Sorbara D. and Zaratti L. (2012). “Hepatitis A: epidemiology and prevention in developing countries”. *World J Hepatol*. N.4, pp. 68-73.
- [5] Georgewill O.A., Georgewill U.O., (2020), “Evaluation of the anti-inflammatory activity of extract of *Vernonia amygdalina*”, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, v3(n2), p.150-151.
- [6] Igile G.O., Oleszek W., Jurzysta M., Burda S., Fafunso M., Fasanmade A.A., (1994), “Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities”, *J. Agric. Food Chem.*, v42(n11), p.2445-2448.
- [7] Vigneron M., Deparis X., Deharo E., Bourdy G., (2005), “Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study”, *J. Ethnopharmacol*, v98(n3), p.351-360.
- [18] Wong F.C., Woo C.C., Hsu A., Tan B.K., (2013), “The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways”, *J. Plos one*, v8(n10).

