

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzym α -glucosidase của Dền gai (*Amaranthus spinosus* L. Amaranthaceae)

Lư Bích Ngọc Giàu^{1,*}, Phan Thiện Vy², Nguyễn Phương Thanh Ngân², Phạm Thị Hương Giang², Phùng Võ Duy Khang²

¹Phòng Khoa học Công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*lbngiauu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm làm rõ đặc điểm thực vật và cung cấp thêm thông tin về hoạt tính hạ đường huyết của Dền gai tại Việt Nam. Dền gai được định danh bằng phương pháp ADN, khảo sát đặc điểm hình thái bằng phương pháp thường quy. Sơ bộ hóa thực vật theo phương pháp Ciuley cải tiến bởi Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Chiết xuất cao toàn phần và 5 cao phân đoạn petroleum ether, chloroform, ethyl acetat, *n*-butanol, nước. Thử hoạt tính chống oxy hóa dựa trên mô hình 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) và ức chế enzym α -glucosidase trên 6 mẫu cao chiết. Nghiên cứu đã xác định được loài Dền gai (*Amaranthus spinosus*) bằng phương pháp giải trình tự gen *matK*, đặc điểm hình thái tương đồng với tài liệu tham khảo. Thành phần hóa học có chứa chất béo, acid hữu cơ, flavonoid, carotenoid, triterpen, saponin, tanin, chất khử và hợp chất polyuronic. Cao phân đoạn chloroform có hoạt tính chống oxy hóa (IC_{50} 144,97 μ g/mL) và ức chế enzym α -glucosidase (IC_{50} 239,25 μ g/mL) tốt nhất. Mẫu chứng dương vitamin C (IC_{50} 10,95 μ g/mL) và acarbose (IC_{50} 254,03 μ g/mL).

Nhận 17/11/2023

Được duyệt 09/01/2024

Công bố 29/03/2024

Từ khóa

Amaranthus spinosus L., enzym α -glucosidase, chống oxy hóa, Amaranthaceae

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Theo Liên đoàn Đái tháo đường Quốc tế (International Diabetes Federation – IDF) năm 2021 có 10,5 % dân số trưởng thành (20-79) tuổi mắc bệnh tiểu đường, trong đó gần một nửa không biết rằng họ đang sống chung với tình trạng này. Đến năm 2045, dự báo của IDF cho thấy cứ 8 người trưởng thành thì có 1 người, khoảng 783 triệu người, sẽ mắc bệnh tiểu đường, tăng 46 %. Hơn 90 % người mắc bệnh tiểu đường type 2, nguyên nhân là do các yếu tố kinh tế xã hội, nhân khẩu học, môi trường và di truyền. Tại Việt Nam, năm 2021, tỷ lệ người trưởng thành mắc đái tháo đường (ĐTĐ) chiếm 6,1 % dân số [1].

Để giảm thiểu các triệu chứng cũng như làm chậm diễn tiến của bệnh ĐTĐ, việc dùng thuốc suốt đời là điều không thể tránh khỏi. Tuy nhiên, việc tuân thủ sử dụng thuốc và các loại bút tiêm insulin đã và đang là trở ngại lớn trong việc đảm bảo và duy trì tính hiệu quả của điều trị [2]. Bên cạnh đó, các tác dụng phụ của các liệu pháp trị ĐTĐ cũng gây ra nhiều lo ngại cho bệnh nhân như sưng cánh tay, chân, tăng cân, hạ đường huyết kéo theo các triệu chứng đi kèm như đổ mồ hôi nhiều, chóng mặt, choáng váng, run rẩy, nhịp tim nhanh, mờ mắt, nói lắp, khó tập trung, ngứa ran ở gan. Vì vậy, hiện nay, bệnh nhân đang có xu hướng lựa chọn các sản phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên để điều trị ĐTĐ như mướp đắng, dây thìa canh, hoài sơn, ...



Dền gai – DG (*Amaranthus spinosus* L. *Amaranthaceae*) là một dược liệu phổ biến trong y học cổ truyền Ấn Độ, Trung Quốc và khu vực Đông Nam Á (Thái Lan, Malaysia,...). Những công dụng nổi bật của DG như điều trị bệnh lý đại tháo đường, viêm dạ dày ruột, lợi tiểu, điều hòa kinh nguyệt, hạ sốt, viêm phế quản,... [3]. Chính vì vậy, DG dần trở thành mục tiêu nghiên cứu tiềm năng của các nhà khoa học trên thế giới. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy dịch chiết các bộ phận của DG có khả năng chống oxy hóa [4], lợi tiểu [5], hạ lipid máu [6]. Khả năng trị ĐTDĐ được nghiên cứu trên cả 2 mô hình in vivo [7] và in vitro [8]. Ngoài ra các nhà khoa học cũng nghiên cứu về tiềm năng chống trầm cảm [9] của DG.

Tại Việt Nam, DG mọc và phân bố ở khắp các tỉnh thành từ Bắc vào Nam, hầu như cây rất dễ sống và thích nghi với những điều kiện sống khắc nghiệt [10]. Tuy nhiên, hiện nay nước ta vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về loài cây này. Người dân địa phương chỉ biết sử dụng theo những kinh nghiệm dân gian như chữa ỉa, trật đả, ứ huyết, thanh nhiệt,... [10]. Những năm gần đây, DG mới được các nhà khoa học Việt Nam quan tâm tìm hiểu nhiều hơn về tác dụng dược lý và thành phần hóa học [11,12]. Có thể thấy DG ở nước ta khá phổ biến, nhưng chưa được khai thác hết những khía cạnh dược lý. Nghiên cứu chi tiết cần thiết để cung cấp thông tin khoa học giúp phát triển loài dược liệu này cho ngành dược phẩm. Vì vậy, việc thực hiện mục tiêu nghiên cứu đặc điểm hình thái; khảo sát sơ bộ thành phần hóa học; khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng mô hình DPPH và hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn nhằm mục đích làm rõ đặc điểm thực vật và cung cấp thêm thông tin về khả năng chống ĐTDĐ của DG tại Việt Nam, là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Toàn cây DG thu mua tháng 12 năm 2022 tại tỉnh Ninh Thuận. Mẫu được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen matK [13]. Dược liệu sau đó được làm sạch, loại bỏ đất cát, phần sâu bệnh và sấy ở 60 °C, xay thành bột lưu tại Bộ môn Dược liệu – Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành để sử dụng cho nghiên cứu.

2.1.2 Dụng cụ, trang thiết bị

Trang thiết bị dùng phân tích hóa học: bình ngưng kết; bể siêu âm Hwashin Technology Power sonic 410 (Korea); kính hiển vi quang học Primo Star Zeiss (Germany); cân xác định độ ẩm MA-45 (Satorius); máy cô quay Heidolph Hei - VAP (Germany); tủ sấy Memmert (Germany); tủ Fume Hood BS 122 (Việt Nam); tủ lạnh bảo quản mẫu Alaska (Việt Nam); bếp cách thủy Memmert (Germany); đèn UV Spectroline Model CM-10A (USA); cân phân tích Sartorius (Germany); cân kỹ thuật Electronic Scale G&G (China); bình sắc ký, ống nghiệm và các dụng cụ trong phòng thí nghiệm.

Trang thiết bị dùng thử hoạt tính sinh học: phần mềm Gen5 (Bio Tek); máy đo quang phổ quét ELISA EPOCH (Bio Tek); máy ly tâm Biofuge Pico (Heraeus); máy đo pH SevenCompact S220 (Mettler Toledo – Switzerland); micropipet thể tích tối đa 1 000 μ L, 100 μ L (Vitlab – Germany); multipipet 20 – 200 μ L (Mettler Toledo – Switzerland); đĩa 96 giếng đáy bằng (Aptaca – Italia).

2.1.3 Dung môi, hóa chất

Dung môi dùng trong phân tích hóa học, sắc ký lớp mỏng đạt tiêu chuẩn phân tích; dung môi dùng cho chiết xuất (ethanol 96 %, petroleum ether, chloroform, ethyl acetat, n-butanol, nước cất, v.v...) thay đổi tùy theo các thực nghiệm cụ thể và được cất lại, làm khan trước khi dùng; hóa chất trong thử nghiệm chống oxy hóa: DPPH (Sigma), vitamin C (Vidipha – Việt Nam); hóa chất trong thử nghiệm ức chế α -glucosidase: enzym α -glucosidase chiết xuất từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma), 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (Sigma), acarbose (Sigma).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen matK

Nguyên vật liệu: mẫu lá khô; hóa chất chiết ADN (Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™), Cat, No. K0512); hóa chất PCR (i-Taq™ DNA Polymerase (iNtRON Biotechnology, Inc.), Cat, No. 25021); môi do công ty Phù Sa cung cấp (gen: matK; forward primer (5'-3'): CGATCTATTCATTCAATATTTTC; reverse primer (5'-3'): TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT) [13].

Phương pháp: dựa theo các tài liệu tham khảo nêu trên có bổ sung cho phù hợp với điều kiện thử nghiệm.

Quy trình thực hiện: chiết ADN (mẫu ADN được chiết theo quy trình chiết ADN của Thermo; mẫu ADN sau khi chiết được kiểm tra nồng độ bằng cách đo quang ở

260 nm); khuếch đại đoạn gen mục tiêu và định danh loài (một phần đoạn ADN mã hóa cho các gen mục tiêu được khuếch đại bằng iTag với nhiệt độ gắn mỗi là 55 °C; các sản phẩm sau khi PCR được kiểm tra sự hiện diện của các băng ADN mục tiêu và gửi giải trình tự ở công ty GeneLab; trình tự ADN sau khi giải được phân tích và so sánh bằng công cụ BLAST với ngân hàng gen để định danh đến loài, với những mẫu có kết quả định danh với các loài khá tương đồng sẽ được giống hàng để tìm loài có mức độ tương đồng cao nhất.

2.2.2 Khảo sát thực vật học

Thu hái các bộ phận mẫu cây DG, đối chiếu mẫu với tài liệu tham khảo [14].

2.2.3 Phân tích sơ bộ thành phần hóa học

Bằng các dụng cụ thường quy và phản ứng định tính đơn giản để sơ bộ xác định nhóm hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, saponin, coumarin, anthraquinon, antraglycosid, proanthocyanidin, anthocyanosid, chất béo, tinh dầu, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử, polyuronic có trong dược liệu ở các phân đoạn có độ phân cực tăng dần theo phương pháp

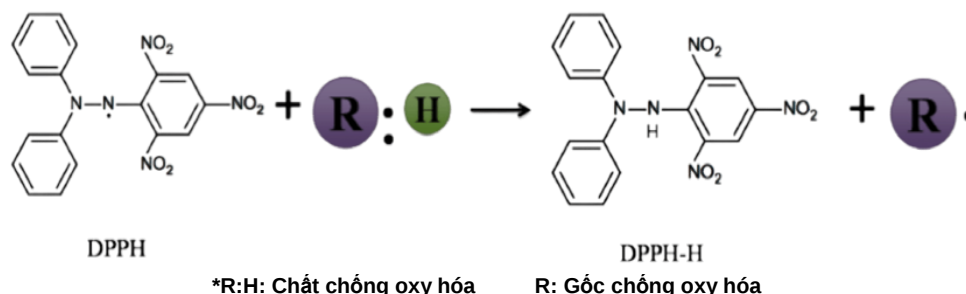
Ciuley đã được cải tiến và sửa đổi bởi Bộ môn Dược liệu – Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP. HCM [15].

2.2.4 Chiết xuất cao toàn phần và chiết tách cao phân đoạn

Dược liệu được chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt với ethanol 96 %. Dịch chiết thu được cô đến đậm đặc sau đó được phân tán vào nước và tiến hành chiết lỏng – lỏng lần lượt với petroleum ether (PE), chloroform (CF), ethyl acetat (EA), n-butanol (BU), nước (N). Cô thu hồi dưới áp suất giảm để thu được các cao phân đoạn.

2.2.5 Thử hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Nguyên tắc: DPPH là một gốc tự do, có khả năng hấp thu các phân tử hydro của các chất chống oxy hóa. Khi cho DPPH tác dụng với một chất có thể cho nguyên tử hydro, chất đó sẽ chuyển sang dạng khử và làm giảm màu tím của DPPH. Do đó, DPPH được dùng để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng $\lambda = 517$ nm [16]. Cơ chế phản ứng được thể hiện ở Hình 1 [17].



Hình 1 Cơ chế khử của DPPH

Chuẩn bị hóa chất dùng trong thí nghiệm: mẫu thử là mẫu cao toàn phần và các cao phân đoạn DG được pha trong MeOH thành dãy nồng độ từ (16-1024) $\mu\text{g/mL}$ (đối với cao khó tan dùng DMSO trợ tan). Mẫu chứng dương là acid ascorbic được pha tương tự mẫu thử thành dãy nồng độ (1,56-100) $\mu\text{g/mL}$. Thuốc thử DPPH nồng độ 0,2 mM pha trong MeOH.

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa: cho lần lượt các loại mẫu vào đĩa 96 giếng (mẫu thử là 100 μL mẫu cao/acid ascorbic và 100 μL DPPH. Mẫu chứng thử là 100 μL mẫu cao/acid ascorbic và 100 μL MeOH/DMSO. Mẫu chuẩn là 100 μL MeOH/DMSO và 100 μL DPPH. Mẫu trắng là 200 μL MeOH/DMSO). Sau đó, hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và đo độ hấp thu quang phổ của DPPH ở bước sóng 517

nm. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Đánh giá kết quả: so sánh hàm lượng DPPH giữa mẫu thử và mẫu chứng âm (không có chất ức chế) để xác định phần trăm ức chế. Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel. Kết quả trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Vẽ đường biểu diễn giữa phần trăm ức chế và nồng độ chất ức chế để xác định chỉ số IC_{50} .

Hoạt tính chống oxy hóa được tính theo công thức:

$$\text{HTCO} (\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{thử}} - A_{\text{chứng thử}}}{A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}}} \right) \right] \times 100$$

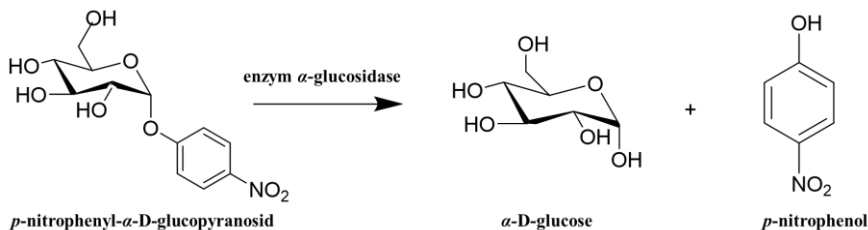
Trong đó: A là độ hấp thu trung bình được đo ở bước sóng 517 nm

HTCO (%) là phần trăm ức chế DPPH

2.2.6 Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được thực hiện theo mô hình của Qaisar và cộng sự năm 2014 [18] có sửa đổi.

Nguyên tắc: enzym α -glucosidase khi gặp liên kết α -glucosid sẽ cắt đứt liên kết này để giải phóng đường D-glucose. Sử dụng chất nền có liên kết α với đường D-glucose như *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid



Hình 2 Phản ứng thủy phân pNPG của enzym α -glucosidase

Chuẩn bị hóa chất dùng trong thí nghiệm: mẫu thử là mẫu cao toàn phần và các cao phân đoạn A. *spinus* được pha trong DMSO thành dãy nồng độ từ (32-2048) μ g/mL, kiểm soát DMSO 2,5 % trong mỗi giếng. Mẫu chứng dương là Acarbose được pha tương tự mẫu thử thành dãy nồng độ (7,5-500) μ g/mL. Enzym α -glucosidase nồng độ 0,2 U/mL pha trong đệm phosphat pH = 6,8. Cơ chất pNPG 4 mM pha trong đệm phosphat pH = 6,8.

Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase: ủ 40 μ L enzym α -glucosidase với 40 μ L mẫu cao/acarbose 20 phút, ở 37 °C trong giếng thử. Cho vào giếng chứng thử 40 μ L mẫu cao/acarbose và 40 μ L đệm pH = 6,8. Giếng chuẩn là 40 μ L enzym α -glucosidase + 40 μ L đệm pH = 6,8. Giếng trắng là 80 μ L đệm pH = 6,8. Sau 20 phút, thêm 40 μ L cơ chất pNPG vào tất cả các giếng, tiếp tục ủ 20 phút ở 37 °C. Kết thúc phản ứng bằng cách thêm 130 μ L Na_2CO_3 0,2 M vào tất cả các giếng. Đo quang ở bước sóng 405 nm. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần

Đánh giá kết quả: so sánh hàm lượng glucose sinh ra giữa mẫu thử và mẫu chứng âm (không có chất ức chế) để xác định phần trăm ức chế. Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel. Kết quả trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Đánh giá ý nghĩa thống kê của hệ số a và b trong phương trình logarit $y = \ln(x) + b$ [19] ($p < 0,05$) bằng phép kiểm Fisher xác định được phương trình hồi quy của các mẫu thử nghiệm. Sau đó, giá trị IC_{50} được xác định bằng cách thay $y = 50$ vào phương trình.

(pNPG), dưới tác dụng của enzym α -glucosidase sẽ thủy phân cho ra đường D-glucose và *p*-nitrophenol (Hình 2). Theo phản ứng, lượng D-glucose tỉ lệ (1:1) với *p*-nitrophenol. Hợp chất *p*-nitrophenol hấp thu ánh sáng nhìn thấy ở bước sóng 405 nm. Từ đó xác định được lượng D-glucose sinh ra sau phản ứng.

Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được tính theo công thức:

$$I (\%) = \left[\frac{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}}) - (A_{\text{thử}} - A_{\text{chứng thử}})}{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}})} \right] \times 100$$

Trong đó: A là độ hấp thu trung bình được đo ở bước sóng 405 nm

I (%) là phần trăm enzym α -glucosidase bị ức chế

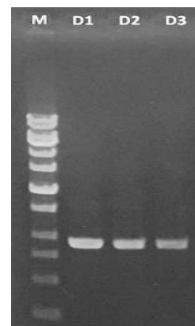
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen *matK*
Kết quả tách chiết ADN tổng số được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1 Kết quả chiết ADN tổng số

Mẫu	OD _{260/280}	Nồng độ ADN (ng/ μ L)
Dền gai	2.016	161

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR được trình bày trong Hình 3.



Hình 3 Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR gen *matK* của 3 mẫu Dền

(M: Marker, D1: Dền com, D2: Dền đỏ, D3: Dền gai)

Kết quả giải trình tự gen *matK* của Dền gai (809 bp):
CACTATAATAATGAGAAAGATTTCGGCATAT
ACGTCCAAATCGGTCAATAATATCAGCATCG

GATAAATCGGTCCAGACCGACTTACTAATGG
GATGACCTAATCCATTACAAAATTTGCGCTTA
GCCAACGAGCCAACCAGAGGAATAATTGGAA
CTATGGTATCAAACCTTCTTAATAATATTATCT
ACTAGAAATGCATTTTCTAACATTTGACTCCG
TATTACTGAAGAATTGAGTCCCACATTTGAA
ATAAAACCCATAAAGTCGAGGGAATAGTTTG
ATAATTTATTGATATAGATTCTTCTTGTTGA
GACCACACAGAAAAATGACATTGCCAGAAAG
CGATAAAGTAATATTTCCATTTATACATCAGA
AAGGATGTCCCTTTTGAAGCCAGAAGGCATT
TTCCTTGATACCGAACATAATGCAGAAAAGG
TTCTTTGAAAAGCCATAGGATAACCCCAAAA

ACCTTAACCTTTGACTTTTACTAGATATTTTAT
CTTTCCGTAAAAATGGATTCTGTTCAAGAAGG
GCTCCAAAAGACGTTGATCGTAAATAAGAGG
ATTGCTTGCGTAGAATAACAAAAATGGATTC
GTATTCATATACAAGAAGATTATATAGGAAC
AAAAAGAATCTTCGATTCTTTTTTGAAAAAGT
GGAAATGGATTCTTTTGGCCTAATAAGACTAT
TCCAATTACGATACTCGTAAAGAAAGTATCG
TAATAAATGCAAGGAAGAGGCATCTTTCAAC
CAATAGCGAAGAGTTTGAACCAAGATTCTA
GATGGGCAGGGTAAGGTATTAATATA.

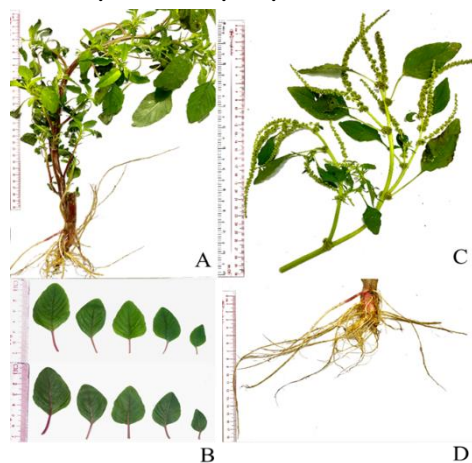
Kết quả phân tích BLAST trên GenBank của DG được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 Kết quả phân tích BLAST trên GenBank của DG

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover (%)	E value	Per, Ident (%)	Acc, Len	Accession
<i>Amaranthus spinosus</i>	1.495	1.495	100	0	100	2.509	MG685171,1
<i>Amaranthus spinosus</i>	1.495	1.495	100	0	100	150.524	NC_065858,1
<i>Amaranthus spinosus</i>	1.495	1.495	100	0	100	150.524	MT526784,1
<i>Amaranthus spinosus</i>	1.495	1.495	100	0	100	150.524	MT526783,1
<i>Amaranthus spinosus</i>	1.495	1.495	100	0	100	813	KC747161,1

Kết luận: Từ kết quả phân tích trình tự gen *matK* cho thấy mẫu DG thuộc loài *Amaranthus spinosus*.

3.2 Khảo sát đặc điểm thực vật



Hình 4 Hình tổng quan cây *A. spinosus*

A. Hình toàn cây *A. spinosus*; B. Lá; C. Cụm hoa; D. Rễ

A. spinosus là cây thân thảo, cao (0,4-1) m hoặc hơn, phân nhánh nhiều (Hình 4.A). Thân tiết diện gần tròn, có góc cạnh tù, màu xanh lục hoặc nâu đỏ, không có lông tơ. Lá đơn, mọc so le, không có lá kèm. Phiến lá nguyên và rộng, hình mũi mác hoặc hình trứng, kích thước [(3-7) cm x (1,5-3) cm], gốc lá nhọn, ngọn lá

thường nhọn hoặc tù. Cuống lá dài gần bằng phiến lá, mặt trên khuyết thành hình lòng máng. Nách lá có 2 gai dài (3-15) mm (Hình 4.B). Hoa đơn tính, không cuống, mọc thành xim, xếp sát nhau ở nách lá hoặc xếp thành thành những bông dài ở đầu cành. Hoa rất nhỏ, màu xanh lục. Hoa đực có 3 lá đài hình trứng thuôn dài, hoa cái có 5 lá đài (Hình 4.C). Rễ cọc, dài, mọc sâu dưới đất giúp cố định thân cây và hấp thụ chất dinh dưỡng (Hình 4.D).

Kết luận: đặc điểm hình thái của mẫu cây DG thu hái tại Ninh Thuận trùng khớp với những mô tả về loài *A. spinosus* [14]. Kết quả giải trình tự ADN của cây DG thu hái tại tỉnh Ninh Thuận tương đồng với trình tự ADN loài *Amaranthus spinosus*. Đây là cơ sở tin cậy để khẳng định tên khoa học của đối tượng nghiên cứu là *Amaranthus spinosus* L. thuộc họ Dền (Amaranthaceae).

3.3 Phân tích sơ bộ thành phần hóa học

Kết quả khảo sát sơ bộ hóa thực vật (Bảng 3) cho thấy toàn cây DG có chất béo, acid hữu cơ, flavonoid; có nhiều carotenoid, triterpen, saponin, tanin, chất khử và hợp chất polyuronic.

Bảng 3 Kết quả khảo sát sơ bộ thành phần hóa học DG

Nhóm hợp chất	Dịch chiết ether	Dịch chiết cồn 96 %	Dịch chiết nước
Chất béo	++	/	/
Carotenoid	++++	/	/
Triterpen	++++	++++	++++
Flavonoid	—	++	—
Tanin	/	++++	—
Saponin	/	+	++++
Acid hữu cơ	/	++	—
Chất khử	/	++++	++++
Hợp chất polyuronic	/	/	++++

Ghi chú: (—) Âm tính, (+) Có ít, (++) Có, (++++) Có nhiều, (/) Không thực hiện

Nguyên liệu ban đầu là 500 g bột toàn cây DG được ngâm kiệt với ethanol 96 % thu được 48,63 g cao EtOH 96 %. Lấy 38,63 g cao EtOH 96 % chiết tách qua nhiều giai đoạn thu được các phân đoạn. Kết thúc quá trình chiết thu được 5 cao phân đoạn: PE (18,53 g), CF (1,23 g), EA (3,70 g), BU (4,16 g), N (4,69 g).

Cao toàn phần và các phân đoạn được khai triển trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:35:10; lớp dưới) để đánh giá sơ bộ thành phần hóa học. Kết quả sắc ký lớp mỏng cho thấy cao CF, cao EA và cao BU xuất hiện nhiều vết tắt quang trên UV 254

và bắt màu với thuốc thử VS. Đây là các cao tiềm năng vì có chứa nhiều hợp chất.

3.5 Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

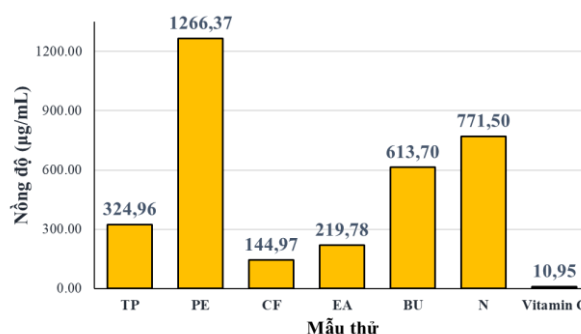
Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc chất chống oxy hóa cho một nguyên tử hydrogen để khử gốc tự do DPPH màu tím thành DPPH-H có màu vàng, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 517 nm. Hiệu quả chống oxy hóa của các cao chiết từ cây DG được xác định dựa vào tỷ lệ HTCO % được trình bày tại Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả hoạt tính chống oxi hóa của mẫu cao chiết A. spinosus

Nồng độ (µg/mL)	Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO %)					
	Cao TP	Cao PE	Cao CF	Cao EA	Cao BU	Cao N
1024	84,72 ± 4,3	54,73 ± 2,0	89,14 ± 7,3	89,11 ± 7,4	65,62 ± 4,7	62,67 ± 1,0
512	51,40 ± 3,8	32,80 ± 1,4	82,15 ± 3,0	72,01 ± 7,6	39,72 ± 3,0	43,53 ± 4,1
256	31,57 ± 9,3	17,16 ± 6,7	68,66 ± 6,8	49,29 ± 17,7	22,91 ± 2,5	30,82 ± 4,6
128	22,28 ± 10,1	11,84 ± 2,8	43,15 ± 5,7	28,90 ± 9,9	13,19 ± 2,3	17,41 ± 1,4
64	13,39 ± 8,3	4,98 ± 4,4	24,85 ± 10,3	15,93 ± 7,8	12,10 ± 4,8	11,71 ± 6,9
32	6,22 ± 1,4	2,76 ± 2,1	14,87 ± 11,3	9,36 ± 2,0	5,61 ± 5,7	9,59 ± 5,5
16	2,55 ± 1,0	1,45 ± 0,9	8,30 ± 5,2	5,65 ± 1,1	1,85 ± 1,5	4,14 ± 3,1

Từ kết quả Bảng 4 cho thấy HTCO % của các cao tăng khi nồng độ tăng, chứng tỏ khả năng chống oxy hóa phụ thuộc vào nồng độ của cao. Ở nồng độ 1.024 µg/mL các mẫu cao thử nghiệm đều ức chế trên 50 %; mẫu chứng dương vitamin C ức chế (90,67 ± 0,2) % ở nồng độ 100 µg/mL.

Dựa vào phần trăm ức chế và nồng độ thử nghiệm xây dựng phương trình đường cong phi tuyến logarith có dạng $y = \ln(x) + b$ [19], từ đó xác định giá trị IC_{50} bằng cách thay $y = 50$ vào đường phi tuyến (Hình 5).



Hình 5 Kết quả IC_{50} hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu thử

Vitamin C có HCTO % ổn định ở cả ba lần đo, với giá trị $IC_{50} = 10,95 \mu\text{g/mL}$. Kết quả Hình 3.15 cho thấy các mẫu cao chiết DG mặc dù không có HCTO % tốt như vitamin C nhưng vẫn có tiềm năng ức chế. Trong đó cao phân đoạn CF có tiềm năng chống oxy hóa tốt nhất với giá trị $IC_{50} = 144,97 \mu\text{g/mL}$, tiếp theo là cao phân đoạn EA ($IC_{50} = 219,78 \mu\text{g/mL}$) và cao TP ($IC_{50} = 324,96 \mu\text{g/mL}$).

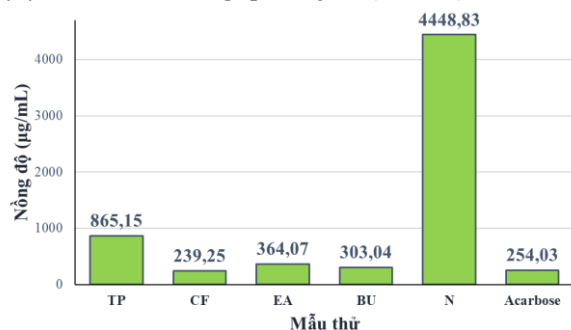
3.6 Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Enzym α -glucosidase được ruột non tiết ra trong quá trình thủy phân tinh bột, các chất ức chế enzym này có tác dụng cạnh tranh, làm chậm quá trình giải phóng α -D-glucose từ disaccharid và oligosaccharid. Phương pháp thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase thực hiện trên đĩa 96 giếng, đo quang ở bước sóng 405 nm. Từ đó xác định được hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase (I %) của các cao chiết DG (Bảng 5).

Bảng 5 Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase cao chiết DG

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Hoạt tính ức chế α -glucosidase (I%)					
	Cao TP	Cao PE	Cao CF	Cao EA	Cao BU	Cao N
2048	-	-	-	$60,02 \pm 3,7$	$53,13 \pm 1,6$	$51,46 \pm 5,1$
1024	$58,01 \pm 0,3$	$41,95 \pm 5,5$	$69,33 \pm 0,3$	$63,76 \pm 4,8$	$46,98 \pm 5,0$	$46,87 \pm 4,7$
512	$47,56 \pm 0,2$	$40,23 \pm 8,5$	$59,74 \pm 2,5$	$44,74 \pm 2,5$	$41,59 \pm 7,1$	$41,41 \pm 1,2$
256	$22,75 \pm 1,4$	$32,18 \pm 2,6$	$50,89 \pm 2,7$	$43,14 \pm 1,6$	$31,25 \pm 1,5$	$38,77 \pm 6,6$
128	$17,81 \pm 0,2$	$31,03 \pm 5,2$	$40,78 \pm 1,9$	$36,42 \pm 4,9$	$30,67 \pm 1,4$	$38,48 \pm 4,3$
64	$13,04 \pm 1,8$	$28,74 \pm 2,6$	$33,20 \pm 3,9$	$35,61 \pm 2,7$	$34,12 \pm 1,1$	$28,14 \pm 4,0$
32	$13,21 \pm 2,4$	$20,11 \pm 2,7$	$27,91 \pm 0,6$	$34,92 \pm 2,0$	$34,75 \pm 3,7$	$32,17 \pm 3,1$

Do độ tan kém nên mẫu cao TP và 2 cao phân đoạn PE, CF được khảo sát ở nồng độ tối đa là $1.024 \mu\text{g/mL}$; 3 cao phân đoạn còn lại gồm EA, BU và N khảo sát ở dãy nồng độ (32-2.048) $\mu\text{g/mL}$. Theo kết quả Bảng 3.4, có thể thấy ở các nồng độ khảo sát cao TP và 4 cao phân đoạn CF, EA, BU, N đều ức chế trên 50 %. Cao PE ức chế tối đa ($41,95 \pm 5,5$) % ở nồng độ $1024 \mu\text{g/mL}$. Dựa vào phần trăm ức chế và nồng độ thử nghiệm xây dựng phương trình đường cong phi tuyến logarit có dạng $y = \ln(x) + b$ [20], từ đó xác định giá trị IC_{50} bằng cách thay $y = 50$ vào đường phi tuyến (Hình 6).



Hình 6 Kết quả IC_{50} hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các mẫu thử

Đánh giá hệ số thống kê của a và b trong phương trình hồi quy cho thấy, các hệ số a và b trong phương trình hồi quy $y = \ln(x) + b$ của cao TP và cao CF có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và phép kiểm Fisher cho kết quả p

$< 0,05$. Trong khi đó, các hệ số b trong phương trình của cao EA, cao BU, cao N và acarbose không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, phương trình hồi quy của các mẫu thử nghiệm lần lượt là:

$$\text{Cao EA: } y = 8,4784\ln(x)$$

$$\text{Cao BU: } y = 8,7506\ln(x)$$

$$\text{Cao N: } y = 5,9521\ln(x)$$

$$\text{Acarbose: } y = 9,0294\ln(x)$$

Mẫu chứng dương acarbose có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với giá trị $IC_{50} = 254,03 \mu\text{g/mL}$. Kết quả Hình 6 cho thấy cao TP và 3 cao phân đoạn (cao CF, cao EA, cao BU) có IC_{50} dưới $1.000 \mu\text{g/mL}$. Trong đó cao CF ức chế tốt nhất với giá trị $IC_{50} = 239,25 \mu\text{g/mL}$, tốt hơn khi so sánh với acarbose. Xếp thứ 2 là cao BU với $IC_{50} = 303,04 \mu\text{g/mL}$ xấp xỉ acarbose và cao EA với $IC_{50} = 364,07 \mu\text{g/mL}$. Như vậy cao CF, cao BU và cao EA có tiềm năng ức chế enzym α -glucosidase.

Khả năng chống oxy hóa của 6 mẫu cao chiết sắp xếp theo thứ tự giảm dần hoạt tính như sau cao CF, cao EA, cao TP, cao BU, cao N, cao PE. Trong đó, cao CF ($IC_{50} = 144,97 \mu\text{g/mL}$) và cao EA ($IC_{50} = 219,78 \mu\text{g/mL}$) có tiềm năng chống oxy hóa mạnh nhất trong các mẫu cao thử nghiệm. Hoạt tính chống oxy hóa của *A. spinosus* có thể do sự xuất hiện của các hợp chất như carotenoid, flavonoid được định tính trong phần sơ bộ hóa thực vật.

Bên cạnh đó, các sắc tố thực vật chính có trong *A. spinosus* là amaranthin và isoamaranthin [21], có khả năng chống oxy hóa tốt hơn các hợp chất phenolic [22]. Cao TP có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase yếu hơn, cao N gần như không có hoạt tính và cao PE ức chế tối đa ($41,95 \pm 5,5$) % ở nồng độ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Có thể do trong cây DG chứa ít hợp chất đối với dung môi không phân cực như petroleum ether. Như vậy sự hiện diện của những chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trong cao chiết toàn cây DG là những chất có độ phân cực từ trung bình đến mạnh. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Mondal và cộng sự (2015) khi tìm ra một acid béo mới có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh – (14E, 18E, 22E, 26E) – methyl nonacos-14, 18, 22, 26 tetraenoat ($\text{IC}_{50} = 6,52 \text{ mM/mL}$) và β -sitosterol trong phân đoạn chloroform [23].

Qua kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme α -glucosidase đối với 6 mẫu cao chiết DG cao phân đoạn CF tiềm năng nhất trong việc tiếp tục định hướng nghiên cứu phân lập các hợp chất có tác dụng điều trị ĐTĐ. Khả

năng chống oxy hóa sẽ hỗ trợ giảm các vấn đề liên qua đến stress oxy hóa trong ĐTĐ.

4 Kết luận

Bằng phương pháp giải trình tự gen *matK*, nghiên cứu đã xác định được loài Dền gai (*Amaranthus spinosus*). Các đặc điểm hình thái của cây cũng được khảo sát và tương đồng với tài liệu tham khảo. Thành phần hóa học của cây chứa chất béo, acid hữu cơ, flavonoid, carotenoid, triterpen, saponin, tanin, chất khử và hợp chất polyuronic. Bằng khảo sát hoạt tính chống oxy hoá với chứng dương là vitamin C và khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với chứng dương acarbose, cao phân đoạn chloroform có hoạt tính chống oxy hóa ($\text{IC}_{50} = 144,97 \mu\text{g/mL}$) và ức chế enzyme α -glucosidase ($\text{IC}_{50} = 239,25 \mu\text{g/mL}$) tốt nhất.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2023.01.55/HĐ-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. Sun H., Saeedi P., Karuranga S., et al. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119.
2. Lê Thu Thủy, Lương Thị Hiền và Hà Quang Tuyền (2022). Nghiên cứu thực trạng tuân thủ sử dụng thuốc và so sánh một số yếu tố ảnh hưởng đến tuân thủ sử dụng thuốc ở người bệnh đái tháo đường type 2 tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 514 (2).
3. Basu S., Ghosh T., Mitra P. and Mitra P. K. (2019). *Amaranthus spinosus* Linn.-past, present and future. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (6), 352-365.
4. Cai Y., Sun M. and Corke H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (8), 2288-2294.
5. Amuthan A., Chogtu B., Bairy K. and Prakash M. (2012). Evaluation of diuretic activity of *Amaranthus spinosus* Linn. aqueous extract in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (2), 424-427.
6. Ahmad M. (2018). *Amaranthus spinosus* Linn: A potential medicinal plant in Unani medicine. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*, 2 (1), 52-54.
7. Mishra S. B., Verma A., Mukerjee A. and Vijayakumar M. (2012). *Amaranthus spinosus* L.(Amaranthaceae) leaf extract attenuates streptozotocin-nicotinamide induced diabetes and oxidative stress in albino rats: A histopathological analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (3), S1647-S1652.
8. Kumar B. A., Lakshman K., Nandeesh R., et al. (2011). *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18 (1), 1-5.
9. Kumar B. A., Lakshman K., Velmurugan C., Sridhar S. and Gopisetty S. (2014). Antidepressant activity of methanolic extract of *Amaranthus spinosus*. *Basic and Clinical Neuroscience*, 5 (1), 11.
10. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển Cây Thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Hà Nội, 792-793.

11. Phạm Nguyễn Kim Tuyen, Nguyễn Thị Thủy Dương, Đỗ Thị Mỹ Liên (2019). Insights into chemical constituents of *Amaranthus spinosus* L.(Amaranthaceae). *Vietnam Journal of Chemistry*, 57 (2), 245-249.
12. Phạm Ngọc Khôi (2022). Khảo sát một số hoạt tính sinh học từ chất trích cây Dền Gai (*Amaranthus spinosus* L.). *Tạp chí Khoa học Đại học Sài Gòn*, 80, 45-50.
13. Yu J., XUE J. H. and ZHOU S. L. (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49 (3), 176-181.
14. Võ Văn Chi (2003), *Từ Điển Thực vật thông dụng*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 263.
15. Trần Hùng, Nguyễn Viết Kinh, Bùi Mỹ Linh, Võ Văn Lẹo và các cộng sự (2015), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh, 2-126.
16. Kedare S. B. and Singh R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
17. Kartini K., Setiawan F., Sukweenadhi J., Yunita O. and Avanti C. (2020). Selection of potential Indonesian plant species for antioxidant. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 457 (1), 012040.
18. Qaisar M. N., Chaudhary B. A., Sajid M. U. and Hussain N. (2014). Evaluation of α -glucosidase inhibitory activity of dichloromethane and methanol extracts of *Croton bonplandianum* Baill. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (11), 1833-1836.
19. Huỳnh Ngọc Trung Dũng, Phạm Lục Thủy Trang, Trần Thị Thương, Dương Thị Bích, Trì Kim Ngọc (2019). Khảo sát sơ bộ hoạt tính sinh học của cao chiết từ vỏ và hạt bơ (*Persea americana*, Lauraceae). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 55(CĐ Công nghệ Sinh học), 98-103.
20. Huỳnh Ngọc Trung Dũng, Nguyễn Trọng Tường (2020). Khảo sát khả năng kháng oxi hóa, ức chế α -glucosidase và gây độc tế bào ung thư vú (MCF-7), ung thư cổ tử cung (HeLa) của cao chiết từ cánh hoa vạn thọ (*Tagetes erecta* L.). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 56(6), 128-138.
21. Stintzing F. C., Kammerer D., Schieber A., et al. (2004). Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59 (1-2), 1-8.
22. Hilou A., Millogo-Rasolodimby J. and Nacoulma O. G. (2013). Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (11), 645-652.
23. Mondal A., Guria T. and Maity T. K. (2015). A new ester of fatty acid from a methanol extract of the whole plant of *Amaranthus spinosus* and its α -glucosidase inhibitory activity. *Pharmaceutical Biology*, 53 (4), 600-604.

Antioxidant activity and α -glucosidase inhibibility of *Amaranthus spinosus* L. Amaranthaceae

Lư Bích Ngọc Giàu^{1*}, Phan Thiện Vy², Nguyễn Phương Thanh Ngân², Phạm Thị Hương Giang², Phùng Võ Duy Khang²

¹Phòng Khoa học Công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*lbngiauu@ntt.edu.vn

Abstract The research was carried out to provide more information about the characteristics and hypoglycemic activity of Amaranth in Viet Nam. *Amaranthus spinosus* L. identified by DNA method, and morphological characteristics were investigated by conventional methods. Preliminary phytochemicals, according to the Ciuley method, were improved by University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City. The total extract and five fractions of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water were investigated. The antioxidant activity was analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay and α -glucosidase enzyme inhibition of 6 extract samples. The species was identified as *A. spinosus* by sequencing the *matK* gene, with morphological characteristics similar to reference documents. The plant chemical composition included fats, organic acids, flavonoids, carotenoids, triterpenes, saponins, tannins, reducing agents and polyuronic compounds. Chloroform fraction extract exhibited the best antioxidant activity (IC₅₀ 144.97 μ g/mL) and α -glucosidase enzyme inhibition (IC₅₀ 239.25 μ g/mL), as compared to the positive controls vitamin C (IC₅₀ 10.95 μ g/mL) and acarbose (IC₅₀ 254.03 μ g/mL).

Keywords *Amaranthus spinosus* L.; enzyme α -glucosidase; antioxidant; Amaranthaceae

