

Tác động ức chế hoạt tính enzym xanthin oxidase và chống oxy hóa *in vitro* của cao cúc chân vịt (*Sphaeranthus africanus* L.)

Trần Văn Tuyên, Trương Thị Vân
Nguyễn Thanh Tuyên, Ngô Kiến Đức*

Bộ môn Hóa Sinh, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

Gout is a fairly common inflammatory arthritis in Vietnam and around the world. The study was for evaluation of *in vitro* xanthin oxidase inhibitory and antioxidant activity of total ethanol extract and the fractions of *Sphaeranthus africanus* L. The results showed that total ethanol extract and all of the fractions of *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water had *in vitro* xanthin oxidase inhibitory and antioxidant activity. In which, ethyl acetate extract had the highest effect with IC_{50} of $651.38 \pm 14.59 \mu\text{g/ml}$ in xanthine oxidase inhibition test (higher than that of allopurinol $1.56 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$) and IC_{50} of $51.55 \pm 1.79 \mu\text{g/ml}$ in the antioxidant test (higher than that of vitamin C $35.15 \pm 0.29 \mu\text{g/ml}$).

Keywords: *Sphaeranthus africanus* L., xanthine oxidase, antioxidant.

Đặt vấn đề

Nghiên cứu các chất có tác dụng ức chế enzym xanthin oxidase (XO) từ dược liệu góp phần sàng lọc các chất điều trị bệnh gout và các bệnh liên quan do quá trình chuyển hóa xanthin thành acid uric là xu hướng được các nhà khoa học quan tâm hiện nay. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng dược liệu cúc chân vịt có tác dụng kháng viêm và khả năng chống ung thư từ các hợp chất phân lập được bao gồm carvotanacetone, triterpenoid^[1, 2]. Để hiểu rõ hơn tiềm năng và có thêm dữ liệu khoa học cho dược liệu cúc chân vịt, đề tài này được thực hiện với mục tiêu đánh giá tác động ức chế hoạt tính enzym xanthin oxidase và chống oxy hóa *in vitro* của cao toàn phần và các cao phân đoạn cúc chân vịt (*Sphaeranthus africanus* L.).

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Cúc chân vịt (*Sphaeranthus africanus* L.)^[3] được thu hái tại Huyện Trà Cú, Tỉnh Trà Vinh vào tháng 1/2021. Mẫu được định danh bằng phương pháp so sánh đặc điểm hình thái với các tài liệu cho kết quả tên khoa học của loài *Sphaeranthus africanus* L.

Phương pháp nghiên cứu

Điều chế cao toàn phần và các cao phân đoạn cúc chân vịt

Dược liệu (toàn cây trên mặt đất) sau khi thu hái được phơi khô trong bóng râm, xay thô đến kích thước thích hợp. Chiết xuất 1,5 kg dược liệu bằng phương pháp ngâm kiệt với cồn 80% (tỷ lệ dược liệu - dịch chiết là 1 g : 10 ml) rồi cất loại dung môi thu được 312,0 g cao toàn phần (độ ẩm 13,71%).

Lấy 100,0 g cao toàn phần phân tán trong nước với tỷ lệ 1:1 rồi lắc phân đoạn lần lượt với các dung môi có tính phân cực tăng dần *n*-hexan, cloroform, ethyl acetate, *n*-butanol. Trong lắc phân đoạn với các dung môi, mỗi lần lắc với 100 ml dung môi, các dung môi đều không màu, sau khi lắc do sự phân tán hoạt

Chịu trách nhiệm: Ngô Kiến Đức
Email: ngokienduc@ump.edu.vn
Ngày nhận: 07/6/2021
Ngày phân biên: 17/6/2021
Ngày duyệt bài: 25/10/2021

chất vào dung môi nên tạo thành phần dịch có màu (lấy phần này). Quá trình lacc phân đoạn được thực hiện đến khi phần dịch thu được (dung môi) gần như không còn màu, rồi chuyển sang lacc phân đoạn với dung môi phân cực kế tiếp. Các phân đoạn thu được và phần nước còn lại được cất loại dung môi thành cao phân đoạn tương ứng.

Đánh giá tác dụng ức chế xanthin oxidase in vitro

Tiến hành dựa trên phương pháp của Tadataka Noro và CS. (1983) có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [4].

Cao toàn phần và các cao phân đoạn súc chân vịt được pha trong DMSO thành dung dịch gốc có nồng độ 10 mg/ml. Sau đó các dung dịch gốc này được pha loãng bằng đệm phosphat pH 7,5 thành các dung dịch thử có nồng độ từ 0,1 – 8,0 mg/ml.

Allopurinol được sử dụng làm mẫu chứng dương với các nồng độ từ 1 - 20 µg/ml.

Mẫu thử gồm: 0,1 ml cao toàn phần hoặc cao phân đoạn; 0,8 ml đệm phosphat pH 7,5; 0,04 ml enzym XO 0,1 U/ml. Ủ trong 5 phút. Sau đó thêm 0,5 ml xanthin và ủ trong vòng 30 phút ở nhiệt độ phòng (25 °C). Tiếp theo thêm 0,3 ml HCl 1 M để dừng phản ứng và thêm 0,3 ml đệm phosphat pH 7,5. Tiến hành đo quang ở bước sóng 295 nm bằng máy quang phổ **UV - Vis**.

Mẫu chứng thay 0,1 ml mẫu cao bằng 0,1 ml đệm phosphat pH 7,5.

Mẫu trắng chứng, mẫu trắng thử thay 0,04 ml enzym XO 0,1 U/ml ở mẫu chứng/thử bằng 0,04 ml đệm phosphat pH 7,5 được tiến hành tương tự. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tác dụng ức chế hoạt động của enzym xanthin oxidase được tính theo công thức:

$$I(\%) = \frac{(OD_c - OD_{tr.c}) - (OD_t - OD_{tr.t})}{OD_c - OD_{tr.c}} \times 100\%$$

Trong đó: OD_c, OD_t lần lượt là độ hấp thụ của mẫu chứng, mẫu thử; OD_{tr.c}, OD_{tr.t} lần lượt là độ hấp thụ của mẫu trắng chứng, mẫu trắng thử.

Thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ và phần trăm ức chế hoạt tính XO từ đó xác định giá trị IC₅₀ ức chế hoạt tính XO của các cao và allopurinol.

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro bằng phương pháp DPPH

Cao toàn phần và các cao phân đoạn được pha trong methanol tuyệt đối thành dung dịch gốc có nồng độ 1 mg/ml rồi pha loãng thành các dung dịch thử ở các nồng độ từ 25 – 500 µg/ml.

Vitamin C được sử dụng làm mẫu chứng dương với các nồng độ từ 11 - 176 µg/ml.

Hỗn hợp phản ứng gồm: 0,125 ml dung dịch mẫu thử; 0,125 ml DPPH 0,6 mM; 0,75 ml methanol. Mẫu chứng âm thay dung dịch mẫu thử bằng 0,125 ml methanol. Sau đó để yên hỗn hợp trong bóng tối ở nhiệt độ phòng (25 °C) trong 30 phút. Tiến hành đo quang ở bước sóng 515 nm bằng máy quang phổ **UV-Vis**. Thí nghiệm được tiến hành 3 lần. Hoạt tính chống oxy hóa (HTCOX) được tính theo công thức:

$$\%HTCOX = \frac{OD_c - OD_t}{OD_c} \times 100\%$$

Trong đó: OD_c là độ hấp thụ của mẫu chứng, OD_t là độ hấp thụ của mẫu thử.

Thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ và phần trăm hoạt tính chống oxy hóa, từ đó xác định giá trị IC₅₀ hoạt tính chống oxy hóa của các cao và vitamin C.

Phương pháp thống kê

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu I (%), % HTCOX được trình bày dưới dạng giá trị trung bình (mean). Giá trị IC₅₀ trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (M ± SD), được tính toán dựa vào đồ thị, phương trình biểu diễn nồng độ và phần trăm ức chế hoạt tính XO/phần trăm hoạt tính chống oxy của các cao ở mỗi thử nghiệm tương ứng.

Kết quả và bàn luận

Tác dụng ức chế hoạt tính enzym XO in vitro của cao súc chân vịt

Kết quả thử nghiệm tác dụng ức chế hoạt tính enzym XO của cao toàn phần và các cao phân đoạn súc chân vịt được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Phần trăm ức chế hoạt tính XO in vitro của các cao

Nồng độ cao ($\mu\text{g/ml}$)	% I ức chế hoạt tính XO					IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	500	1000	1500	2000	2500	
Toàn phần	20,03	31,55	44,31	64,61	85,59	1536,27 \pm 34,04
n-hexan	9,51	26,15	32,58	58,32	66,29	1892,26 \pm 19,83
Cloroform	7,26	23,60	34,19	42,51	53,25	2305,36 \pm 39,53
Nồng độ cao ($\mu\text{g/ml}$)	100	300	500	1000	1500	
Ethyl acetat	18,60	37,98	44,96	63,43	90,69	651,38 \pm 14,59
n-butanol	11,21	27,08	33,97	60,89	82,21	819,54 \pm 9,79
Nồng độ cao ($\mu\text{g/ml}$)	4000	5000	6000	7000	8000	
Cao nước	21,39	28,99	38,91	53,79	57,98	6929,22 \pm 302,63
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	1	2	5	10	20	
Allopurinol	42,79	52,67	74,07	83,12	89,30	1,56 \pm 0,06

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy phần trăm ức chế hoạt tính enzym XO của các cao tăng khi nồng độ tăng, chứng tỏ khả năng ức chế enzym XO phụ thuộc vào nồng độ cao. Trong đó, cao phân đoạn ethyl acetat của cúc chân vịt ức chế hoạt tính enzym XO mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 651,38 \pm 14,59 $\mu\text{g/ml}$ cao hơn IC₅₀ của allopurinol (1,56 \pm 0,06 $\mu\text{g/ml}$). Phân đoạn

cao nước cho khả năng ức chế hoạt tính enzym yếu nhất.

Tác dụng chống oxy hóa in vitro của cao cúc chân vịt

Kết quả đánh giá tác dụng chống oxy hóa của cao toàn phần và các cao phân đoạn cúc chân vịt được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Phần trăm hoạt tính chống oxy hóa in vitro của các cao

Nồng độ cao ($\mu\text{g/ml}$)	% Hoạt tính chống oxy hóa									IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	25	50	100	125	150	200	300	400	500	
Toàn phần	-	25,87	39,96	-	-	55,32	70,07	84,64	-	178,13 \pm 2,33
n-hexan	-	-	36,03	-	-	51,09	66,74	85,31	92,70	188,96 \pm 9,03
Cloroform	-	-	38,77	-	-	47,09	65,21	84,08	91,91	192,43 \pm 4,62
Ethyl acetat	34,22	51,42	75,21	87,77	93,14	-	-	-	-	51,55 \pm 1,79
n-butanol	30,46	36,27	51,86	-	-	74,98	87,82	-	-	105,43 \pm 4,77
Nước	-	-	29,63	-	-	43,43	49,03	62,12	74,64	282,58 \pm 0,012
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	11	22	44	88	176	-	-	-	-	
Vitamin C	13,25	34,05	59,84	81,29	96,04	-	-	-	-	35,15 \pm 0,29

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy phần trăm hoạt tính chống oxy hóa của các cao tăng khi nồng độ tăng, chứng tỏ khả năng chống oxy hóa phụ thuộc vào nồng độ cao. Trong đó, cao ethyl acetat của cúc chân vịt thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao nhất với IC₅₀ bằng 51,55 \pm 1,79 $\mu\text{g/ml}$ và gấp 1,47 lần IC₅₀ của vitamin C (5,15 \pm 0,29 $\mu\text{g/ml}$). Cao nước cho hoạt tính chống oxy hóa thấp nhất.

Cúc chân vịt (*Sphaeranthus africanus* L.) là một loài thực vật phân bố rộng rãi ở Việt Nam, nếu các nghiên cứu khoa học chứng minh được có các tác dụng sinh học hữu ích, có thể

góp phần vào nguồn dược liệu sử dụng trực tiếp hoặc để phân lập các hợp chất có tác dụng cho điều trị các bệnh lý liên quan. Mặc dù vậy, các nghiên cứu về loài cây này còn hạn chế, đây là lần đầu tiên tác động ức chế hoạt tính xanthin oxidase và khả năng chống oxy hóa của cúc chân vịt được đưa vào nghiên cứu khoa học để đánh giá một cách nghiêm túc.

Ở thử nghiệm đầu tiên, các cao cúc chân vịt đều cho thấy khả năng ức chế XO với giá trị IC₅₀ được xác định. Mặc dù vậy ngay cả cao ethyl acetat có hiệu lực ức chế cao nhất với giá trị IC₅₀ thấp nhất là 651,38 \pm 14,59 $\mu\text{g/ml}$

cũng cao hơn nhiều lần so với IC₅₀ của allopurinol là 1,56 ± 0,06 µg/ml cho thấy khả năng ức chế XO các cao cúc chân vịt là không cao. Nguyên nhân có thể là hàm lượng các nhóm hoạt chất có nguồn gốc thực vật được cho là có tác dụng ức chế XO *in vitro* như flavonoid, alkaloid, tinh dầu, phenolic, tannin, iridoid glucosid, coumarin^[5] trong các cao chiết là không cao. Một số nghiên cứu đã thực hiện như nghiên cứu của Trần Thị Huyền (2019)^[6] hay Ragasa (2014)^[7] đã phân lập được một số hợp chất từ cúc chân vịt như các dẫn chất carvotacetone, asperglaucid, chrysoplenol D, squalene, spinasterol và stigmasterol, nhưng các hợp chất này cũng chưa được đánh giá về tác dụng ức chế XO trong nghiên cứu thực nghiệm này hay cho thấy tác dụng ức chế XO trong bất kỳ nghiên cứu nào khác. Vì vậy, kết quả về tác dụng ức chế XO của cao cúc chân vịt trong nghiên cứu này góp phần cung cấp thêm vào dữ liệu khoa học của dược liệu cúc chân vịt, dù hoạt tính sinh học còn thấp.

Ở thử nghiệm thứ hai, các cao cúc chân vịt cho thấy đều có tác dụng chống oxy hóa với giá trị IC₅₀ dao động trong khoảng từ thấp nhất ở cao ethyl acetat (51,55 ± 1,79 µg/ml) đến cao nhất ở cao phân đoạn nước (282,58 ± 0,012 µg/ml). So với giá trị IC₅₀ của vitamin C (35,15 ± 0,29 µg/ml), một chất có khả năng chống oxy mạnh, các cao cúc chân vịt có tác dụng chống oxy hóa khá tốt, nhất là cao ethyl acetat và n-butanol. Trong các hợp chất đã được phân lập từ cúc chân vịt như trình bày ở trên, squalene đã được báo cáo về hoạt tính chống oxy hóa trên cả *in vitro* và *in vivo*^[8], chrysoplenol D cũng cho thấy mối tương quan thuận với khả năng chống oxy hóa^[9] có thể giải thích một phần hoạt tính chống oxy hóa các cao. Với kết quả thu được này, khả năng chống oxy hóa tốt của cao cúc chân vịt, đặc biệt là phân đoạn ethyl acetat, có thể tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn ở các thử nghiệm *in vivo* để góp phần nâng cao giá trị sử dụng của dược liệu này trong việc nghiên cứu và bào chế các thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan.

Kết luận

Nghiên cứu đánh giá được khả năng ức chế hoạt tính enzym XO và chống oxy hóa *in vitro* của cao toàn phần và các cao phân đoạn cúc chân vịt (*Sphaeranthus africanus* L.). Trong đó, cao ethyl acetat có hiệu lực cao nhất với IC₅₀ trong thử nghiệm ức chế XO là 651,38 ± 14,59 µg/ml (IC₅₀ của allopurinol 1,56 ± 0,06 µg/ml) và IC₅₀ trong thử nghiệm chống oxy hóa là 51,55 ± 1,79 µg/ml (IC₅₀ của vitamin C 35,15 ± 0,29 µg/ml).

Tài liệu tham khảo

1. Mahajan N. G., Chopda M. Z., Mahajan R. T. (2015), "A review on *Sphaeranthus indicus* Linn: Multipotential medicinal plant", *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 4 (3), pp. 48-74.
2. Perry L. M. (1980), "Medicinal plants of east and southeast asia attributed properties and uses", *The MIT press*, London.
3. Viện Dược liệu (2016), *Sphaeranthus africanus* L., In: Danh mục Cây thuốc Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 264.
4. Noro T., Oda Y., Miyase T., Ueno A., Fukushima S. (1983), "Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31 (11), pp. 3984-3987.
5. Ling X. & Bochu W. (2014), "A review of phytotherapy of gout: Perspective of new pharmacological treatments", *Die Pharmazie*, 69 (4), pp. 243-256.
6. Huyen Tran Thi et al. (2019), "Anti-inflammatory and antiproliferative compounds from *Sphaeranthus africanus*", *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 62, pp. 152951.
7. Ragasa C. Y. et al. (2014), "Chemical constituents of *Sphaeranthus africanus*", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6 (7), pp. 2197-2220.
8. Kim S. K., & Karadeniz F. (2012), "Biological importance and applications of squalene and squalane", *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, pp. 223-233.
9. Luo S. Q., Yuan L., Wu Y. K. & Huang J. G. (2013), "Zhongguo Zhong yao za zhi", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 38 (10), pp. 1493-1499.