

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của cây rau sam (*Portulaca oleracea* L.) *in vitro* bằng phương pháp HPLC-ESR và *in vivo* trên ruồi giấm chuyển gen

- **Đái Thị Xuân Trang**
- **Trương Thị Phương Thảo**
Trường Đại học Cần Thơ
- **Kaeko Kamei**
Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản

(Bài nhận ngày 06 tháng 3 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 10 năm 2015)

TÓM TẮT

Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của cây rau sam (*Portulaca oleracea* L.) *in vitro* được thực hiện bằng phương pháp nhận diện điện tử tự do HPLC-ESR. Phân tích HPLC-ESR dựa trên tín hiệu ESR của sản phẩm giữa gốc tự do (reactive oxygen species: ROS) với thuốc thử DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) (DMPO/O₂). Trong thí nghiệm kháng oxy hóa *in vitro* bởi cao chiết với dung môi nước của rau sam và hệ thống HPLC-ESR, tín hiệu ESR cho thấy nồng độ của sản phẩm DMPO/O₂ giảm 20 % và độ hấp thụ gốc tự do giảm từ 0,08 đến gần 0,06, chứng minh rằng cao chiết có hoạt

chất kháng oxy hóa khá cao làm giảm các gốc tự do. Hoạt tính kháng oxy hóa của rau sam được xác định bằng cách so sánh tổng diện tích nhám trên mắt ruồi đột biến trước và sau thí nghiệm. Ở nghiệm thức với nồng độ 20 %, bột nghiền và cao chiết rau sam có khả năng làm giảm diện tích nhám trên mắt ruồi. Sau thí nghiệm trên, mắt ruồi được phục hồi lại lần lượt là 81,72 % và 87,33 % ở bột nghiền và cao chiết rau sam. Từ các kết quả đạt được chứng minh rằng cây rau sam có chứa các chất có khả năng kháng oxy hóa cao.

Từ khóa: DMPO, GMR-GAL4/UAS-hDuoX2, HPLC-ESR, kháng oxy hóa, *Portulaca oleracea* L., rau sam.

MỞ ĐẦU

Stress oxy hóa là hiện tượng mất cân bằng xảy ra giữa quá trình sản sinh quá mức các gốc tự do (Reactive oxygen species: ROS) với hệ thống bảo vệ kháng oxy hóa bên trong cơ thể [1]. Gốc oxy hóa tự do là một trong những nguyên nhân chính gây stress oxy hóa, dẫn đến các căn bệnh nghiêm trọng như tim mạch, ung thư, Alzheimer, Parkinson và lão hóa [2, 3]. Thử nghiệm kháng oxy hóa *in vitro* của thảo dược được tiến hành rất

phổ biến và đơn giản, tuy nhiên xét về tổng thể các nghiên cứu về thảo dược bằng phương pháp *in vitro* chưa đánh giá được hiệu quả cũng như những tác dụng không mong muốn khi ứng dụng trên cơ thể sống [4, 5]. Nhiều công trình nghiên cứu về kháng oxy hóa *in vitro* chỉ được tiến hành trên một vài thí nghiệm cơ bản, chưa khảo sát đồng thời hiệu quả cũng như sự hiện diện của các hợp chất kháng oxy hóa có trong thảo dược [6].

Mô hình ruồi giấm biến đổi gen GMR-GAL4/UAS-hDuox2 mang gen gây biểu hiện oxy hóa quá mức protein hDuox2 (thuộc nhóm enzyme oxy hóa NADPH, NADPH oxidase) đã được thử nghiệm thành công và được công bố là mô hình hữu hiệu cho khảo sát kháng oxy hóa của thảo dược [7]. Rau sam (*Portulaca oleracea* L.) phân bố rộng rãi ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long, dễ trồng và được biết có tiềm năng kháng oxy hóa [8] nhưng có ít công trình nghiên cứu về kháng oxy hóa của rau sam ở Việt Nam. Nghiên cứu khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của rau sam trên phương pháp cải tiến HPLC-ESR (high performance liquid chromatography – electron spin resonance) có nhiều ưu điểm giúp nhận diện nhanh và chính xác các gốc oxy hóa tự do *in vitro* [9], thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa của rau sam *in vivo* trên mô hình ruồi giấm biến đổi gen GMR-GAL4/UAS-hDuox2 [7] góp phần đánh giá tổng quan hiệu quả kháng oxy hóa của thảo dược và khắc phục được những hạn chế của các nghiên cứu kháng oxy hóa chỉ với phương pháp *in vitro* [6].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu gồm máy trộn mẫu Vortex, cân phân tích Mettler Toler (Thụy Sĩ), máy sấy chân không lạnh (Nhật), kính hiển vi điện tử VE 7800 (Nhật), máy ly tâm lạnh Hitachi CR21GIII (Nhật).

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm diethyl ether (Kyoto, Japan), agar, bột bắp, nấm men, glucose, pokin, acid probionic, diethyl ether, 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) (Labotec), acid ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic (EDTA) và 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL, Sigma Aldrich).

Vật liệu thí nghiệm là thân và lá rau sam (*Portulaca oleracea* L.) được thu tại tỉnh Trà Vinh.

Đối tượng thí nghiệm là ruồi giấm biến đổi gen GMR-GAL4/UAS-hDuox2 và GMR-GAL4/UAS-DREF [7], đực và cái, khỏe mạnh, do Viện Công nghệ Kyoto (Nhật Bản) cung cấp. Ruồi giấm GMR-GAL4/UAS-hDuox2 mang protein hDuox2, ở người protein hDuox1 và hDuox2 thuộc nhóm enzyme oxy hóa NADPH (NADPH oxidase), được tìm thấy trong tuyến giáp, mô não, tiểu não, tuyến vú, cơ bắp, thần kinh, nhau thai và tinh hoàn [10, 11]. Các gen mã hóa cho hai enzyme hDuox1 và hDuox2 nằm trên nhiễm sắc thể số 15, hai dạng đồng phân hDuox1 và hDuox2 có 83 % trình tự gen tương đồng [12, 13]. Trong tuyến giáp, các enzyme hDuox là nguồn sản sinh H₂O₂, giúp hỗ trợ cho quá trình oxy hóa iod trong hormone tuyến giáp. Đột biến gen hDuox2 là nguyên nhân chính gây ra các căn bệnh suy giáp [11]. Con lai GMR-GAL4/UAS-hDuox2 mang gen hDuox2 biểu hiện vượt trội gây ra kiểu hình mắt nhám so với mắt ruồi bình thường.

Phương pháp

Phương pháp thu mẫu và nghiền rau sam

Rau sam (*Portulaca oleraceae* L.) được thu hái gồm rễ, thân, lá; định danh theo Phạm Hoàng Hộ [14]. Cắt bỏ rễ, phần thân và lá rau sam còn lại được đông lạnh ở tủ đông -80 °C. Sau đó mẫu được sấy khô bởi máy sấy lạnh chân không (Freeze dried machine) liên tiếp trong 3 ngày với nhiệt độ -85 °C, áp suất 10 Pa. Trọng lượng mẫu sau khi sấy khô được xác định, nghiền nhuyễn. Bột nghiền sau đó được lọc qua lọc có kích cỡ 20 µm và được bảo quản ở nhiệt độ -30 °C.

Trích cao rau sam bằng dung môi nước

Mẫu bột nghiền rau sam được trộn đều bằng máy trộn mẫu (Vortex) với nước khử khoáng, hỗn hợp dung dịch mẫu được giữ lạnh 30 phút ở 4 °C. Dung dịch mẫu được đem ly tâm ở 4 °C 3 lần ở tốc độ 15000 vòng/ phút trong 10 phút. Phần bã sau ly tâm được loại bỏ, phần dịch lỏng sau ly tâm được đông lạnh ở -30 °C trong một ngày, dịch trích được sấy khô bằng máy sấy chân không và được trữ lạnh để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của bột nghiền (hoặc cao chiết) rau sam in vivo

Khả năng kháng oxy hóa của bột nghiền (hoặc cao chiết) rau sam được khảo sát dựa trên khả năng làm giảm diện tích vùng mắt nhắm trên mắt ruồi giấm đột biến.

Tiến hành thí nghiệm: Bột nghiền (hoặc cao chiết) rau sam được phối trộn với thức ăn nhanh (v/v) (CAROLINA) của ruồi giấm và nước khử khoáng ở 4 nồng độ khác nhau: 0 %, 5 %, 10 % và 20 %. Chọn ngẫu nhiên 4 cặp ruồi đực và cái cho vào ống nghiệm.

Bốn cặp ruồi đực và cái được chọn và cho vào ống nghiệm nuôi ở điều kiện nhiệt độ 25 °C. Sau khoảng hai ngày, quan sát môi trường thức ăn ruồi nếu thấy trứng ruồi xuất hiện và phát triển thành giai đoạn ấu trùng thì loại bỏ ruồi bố mẹ. Ruồi con trưởng thành sau 10 ngày thí nghiệm. Vùng mắt ruồi được cố định và được quan sát dưới kính hiển vi điện tử VE7800 (Keyence Inc., Osaka, Japan). Khả năng kháng oxy hóa của bột rau sam (hoặc cao chiết) được xác định dựa trên tỷ lệ giảm vùng mắt nhắm ở ruồi. Tỷ lệ diện tích vùng mắt ruồi được đo bằng phần mềm Image J. và hiệu quả vùng mắt nhắm ruồi phục hồi được tính theo công thức:

Hiệu suất kháng oxy hóa được tính dựa trên tỷ lệ vùng mắt nhắm được phục hồi theo công thức:

Hiệu suất kháng oxy hóa = 100 % - ((diện tích nhắm/diện tích toàn bộ mắt) × 100)

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa in vitro bằng hệ thống HPLC-ESR và phân tích thành phần cao chiết

Mục đích thí nghiệm là khảo sát khả năng ức chế của cao rau sam tới hoạt động của các gốc khử tự do *in vitro* dựa vào phản ứng của gốc khử tự do với thuốc thử 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO). DMPO ở trạng thái không bền vững rất nhạy phản ứng với gốc khử tự do tạo sản phẩm bền DMPO/O₂, kết quả phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 254 nm. Hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) được sử dụng để phân tích thành phần các hợp chất có trong cao chiết.

Tiến hành thí nghiệm: Cao rau sam 4 mg/mL được pha trong dung dịch đệm phosphate 0,1 M pH=7,4. Mẫu chuẩn bị được dẫn qua cột sắc ký gel (TOSOH, G3000PW, 7,5 mm i.d × 30 cm), trong đó một phần mẫu sẽ được tách phân đoạn, phần còn lại được dẫn vào hệ thống ESR (Electron spin resonance, ESR). Thuốc thử phản ứng với gốc tự do ESR gồm 3 loại: DMPO, Rf (Riboflavin) và EDTA với nồng độ lần lượt là 210 mM, 100 μM và 10,5 mM. Phối trộn hỗn hợp thuốc thử và cao chiết rau sam, hỗn hợp sau cùng được dẫn qua dòng tế bào chiếu xạ tia UV. Tín hiệu cuối cùng được ghi nhận thông qua đo nồng độ sản phẩm DMPO/O₂ ở bước sóng 254 nm.

Thống kê và phân tích số liệu

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 và vẽ đồ thị bằng Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của rau sam trên mô hình ruồi giấm biến đổi gen

Hiệu quả kháng oxy hóa của rau sam (bột nghiền hoặc cao chiết) được khảo sát dựa trên sự ức chế sự biểu hiện gen *hDuoX2*. Sự biểu hiện của gen *hDuoX2* dẫn đến sự tạo thành quá mức

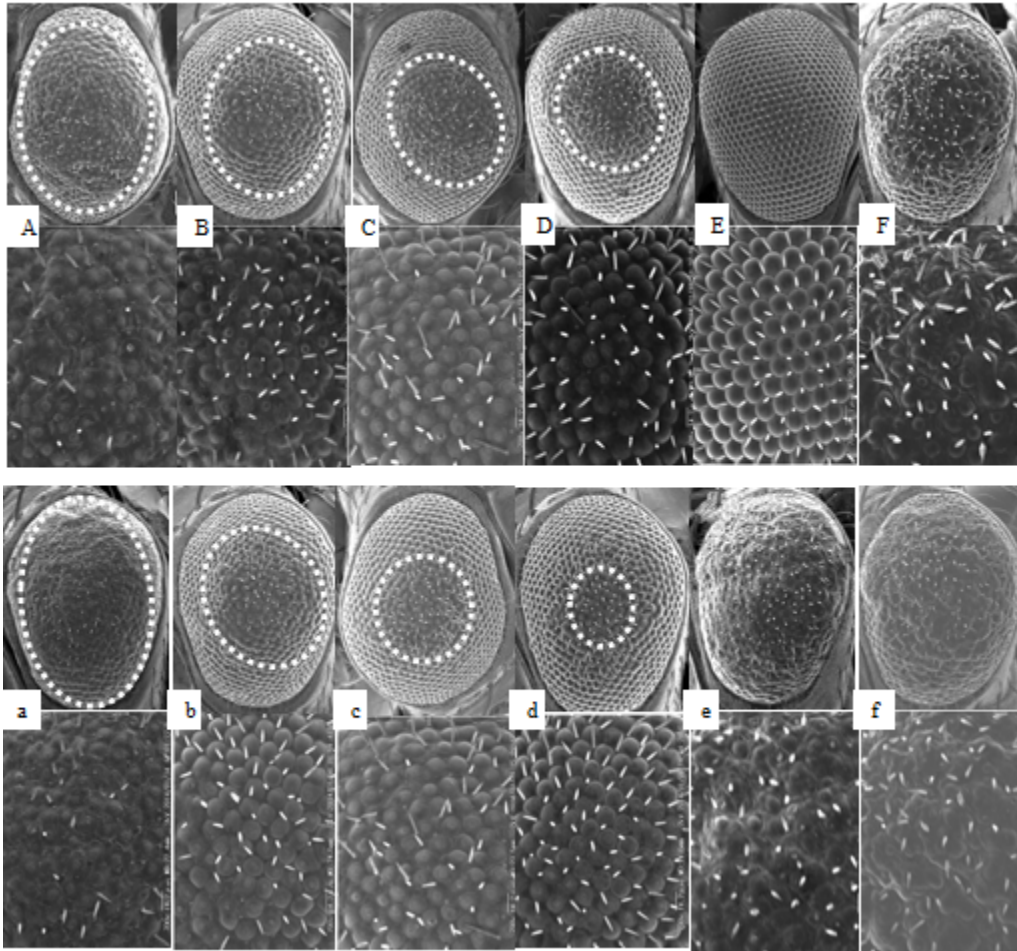
protein là enzyme NADPH oxidase, enzyme NADPH oxidase xúc tác phản ứng oxy hóa tạo nên các gốc tự do (ROS) là nguyên nhân gây stress oxy hóa. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự biểu hiện của gen *hDuoX2* trên đĩa thị giác ở ruồi giấm (GMR-GAL4/UAS- *hDuoX2*) tạo nên kiểu hình mắt nhắm [7, 15]. Mô hình ruồi giấm biến đổi gen *hDuoX2* được sử dụng để sàng lọc các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa, sự hiện diện của các hợp chất kháng oxy hóa là nguyên nhân làm ức chế sự biểu hiện của gen *hDuoX2*, dẫn đến NADPH oxidase không được tạo ra và như vậy lượng ROS được tạo ra sẽ ít đi. Sự giảm biểu hiện của gen *hDuoX2* làm kiểu hình mắt nhắm của ruồi giấm (Hình 1A và 1a) được phục hồi thành kiểu hình mắt bình thường (Hình 1E). Mô hình này cũng đã được chứng minh là có hiệu quả khi nghiên cứu sự kháng oxy hóa của lá dâu tằm [7]. Trong thí nghiệm này, ruồi giấm biến đổi gen GMR-GAL4/UAS-DREF cũng được sử dụng như ruồi đối chứng cho kiểu hình mắt nhắm (Hình 1F), ruồi giấm UAS-DREF do yếu tố phiên mã DREF kiểm soát [7], sự biểu hiện kiểu hình mắt nhắm của dòng ruồi giấm UAS-DREF không thay đổi khi bổ sung bột nghiền hoặc cao chiết rau sam nồng độ 20 % (Hình 1e và 1f).

Diện tích vùng nhắm ở mắt ruồi trước và sau thí nghiệm với bột nghiền hoặc cao chiết rau sam được xem là chỉ tiêu xác định hoạt tính kháng oxy hóa. Kiểu hình mắt nhắm ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung bột nghiền hoặc cao chiết lá sa kê) (Hình 1A và 1a) quan sát được trên toàn bộ diện tích của mắt ruồi nhắm và được xem như 100 %. Hiệu quả kháng oxy hóa được xác định dựa trên tỷ lệ phục hồi kiểu hình mắt nhắm thành kiểu hình hoang dại bằng cách so sánh diện tích vùng nhắm trên mắt ruồi ở ba nghiệm thức với nồng độ 5 %, 10 %, 20 % bột nghiền (hoặc cao chiết) rau sam với nhóm ruồi giấm GMR-GAL4/UAS- *hDuoX2* đối chứng (không bổ sung bột nghiền (hoặc cao chiết (0 %))).

Kết quả trình bày ở Hình 1 cho thấy, diện tích nhắm ở mắt ruồi được đo sau thí nghiệm ở ba nồng độ bột nghiền 5 %, 10 % và 20 % (Hình 1B, 1C và 1D) và tỷ lệ mắt nhắm được phục hồi về kiểu hình mắt hoang dại (bình thường) được trình bày trong Bảng 1. Kết quả cho thấy vùng nhắm ở mắt ruồi giảm dần tỉ lệ thuận với nồng độ bột nghiền. Hiệu quả khôi phục kiểu hình mắt nhắm về kiểu hình mắt hoang dại ở 3 nồng độ 5 %, 10 % và 20 % lần lượt là $50,47 \pm 11,24$; $72,03 \pm 10,25$ và $81,72 \pm 6,11$ %. Kết quả thí nghiệm chứng minh ở cả 3 nồng độ của bột nghiền cho hiệu quả ức chế biểu hiện gen *hDuoX2* khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5 %. Hiệu quả kháng oxy hóa đạt khoảng 81,72 % khi bổ sung 20 % (v/v) bột nghiền vào thức ăn ruồi giấm thí nghiệm.

Ngoài ra, thí nghiệm cũng được thực hiện tương tự khi rau sam được chiết xuất các hợp chất bằng dung môi nước. Kết quả khi bổ sung 5 %, 10 % và 20 % cao chiết rau sam vào thức ăn ruồi được trình bày trong Hình 1 (1b, 1c và 1d) cho thấy diện tích nhắm trên mắt ruồi còn lại sau thí nghiệm tương đương so với bột nghiền cùng tỷ lệ. Tỷ lệ khôi phục kiểu hình mắt nhắm về kiểu hình mắt hoang dại ở nồng độ cao chiết 5 %, 10 % và 20 % lần lượt là $58,55 \pm 3,19$; $71,49 \pm 6,15$ và $87,33 \pm 4,08$ (Bảng 1). Kết quả thí nghiệm chứng minh khi bổ sung cao chiết ở 3 nồng độ khảo sát thì hiệu quả kháng oxy hóa dựa trên sự ức chế sự biểu hiện gen *hDuoX2* khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5 %. Hiệu quả kháng oxy hóa đạt cao nhất khoảng 87,33 % khi bổ sung 20 % (v/v) cao chiết vào thức ăn ruồi giấm trong thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng oxy hóa dựa trên sự phục hồi kiểu hình mắt nhắm của ruồi giấm biến đổi gen *hDuoX2* trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của lá dâu tằm trong nghiên cứu của Anh *et al.*, [7].



Hình 1. Khả năng khôi phục mắt ruồi mắt nhám (GMR-GAL4/UAS-hDuoX2) về trạng thái bình thường của rau sam

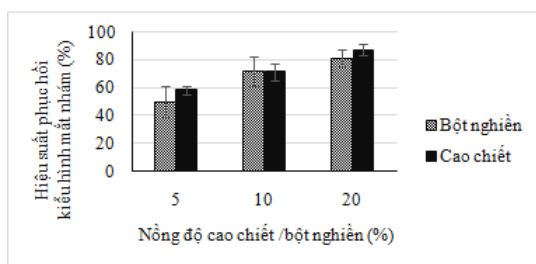
Chữ in hoa A, B, C, D tương ứng nồng độ bột nghiền, chữ in thường a, b, c, d tương ứng nồng độ cao chiết ở 0, 5, 10 và 20 %; (E) ruồi hoang dại có kiểu mắt bình thường; (F) ruồi biến đổi gen (GMR-GAL4/UAS-DREF) có kiểu hình mắt nhám; (e) và (f) ruồi biến đổi gen (GMR-GAL4/UAS-DREF) được bổ sung 20 % bột nghiền và cao chiết rau sam; bên trong vòng tròn là diện tích nhám còn lại, phần bên ngoài là diện tích nhám đã phục hồi; phần hình bên trên mỗi chú thích là mắt ruồi ở độ phóng đại 200 lần; hình bên dưới là mắt ruồi ở độ phóng đại 700 lần.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ bột nghiền (hoặc cao chiết) rau sam lên khả năng phục hồi kiểu hình mắt nhám ở ruồi GMR-GAL4/UAS-DREF về kiểu hình mắt bình thường

Thí nghiệm	Hiệu quả phục hồi kiểu hình mắt nhám (%)	
	Bột nghiền	Cao chiết
5 %	50,47 ^a ± 11,24	58,55 ^a ± 3,19
10 %	72,03 ^b ± 10,25	71,49 ^b ± 6,15
20 %	81,72 ^c ± 6,11	87,33 ^c ± 4,08

Ghi chú: Các giá trị có các mẫu tự theo sau trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 5 %.

So sánh hiệu quả kháng oxy hóa của bột nghiền và cao chiết rau sam được trình bày ở Hình 2 cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa của bột nghiền và cao chiết rau sam gần như tương đương nhau ở tất cả các nồng độ khảo sát. Tuy nhiên, ở nồng độ 5 % và 20 % cao chiết có hiệu quả cao hơn bột nghiền nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Từ kết quả thí nghiệm có thể kết luận sử dụng bột nghiền hay cao chiết bằng dung môi nước rau sam đều có hiệu quả kháng oxy hóa tương đương nhau trong mô hình ruồi giấm biến đổi gen GMR-GAL4/UAS-hDuoX2.



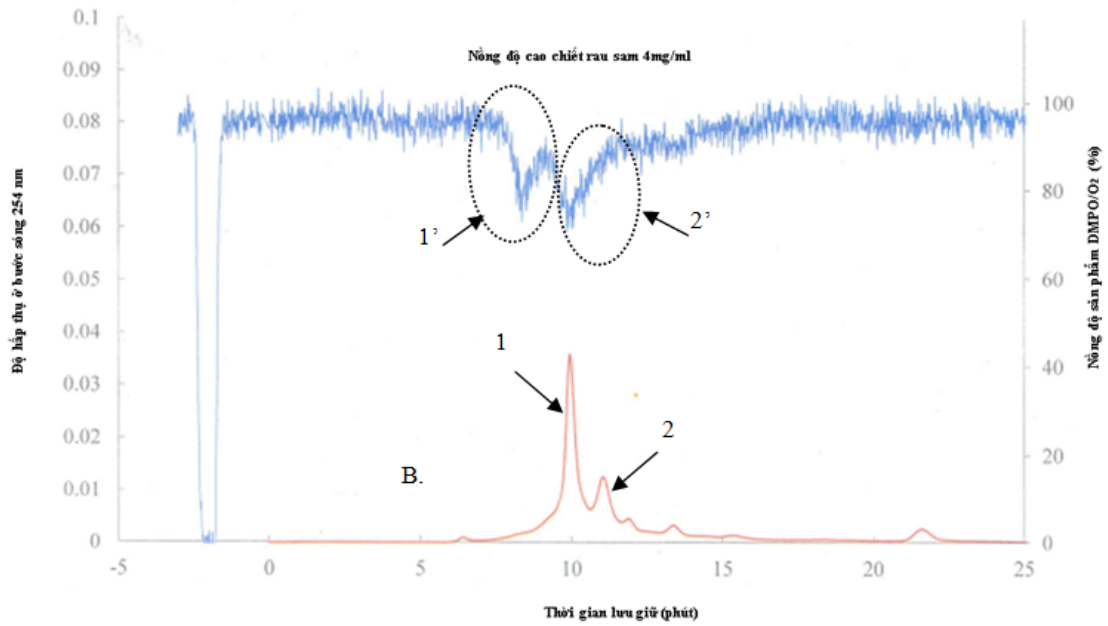
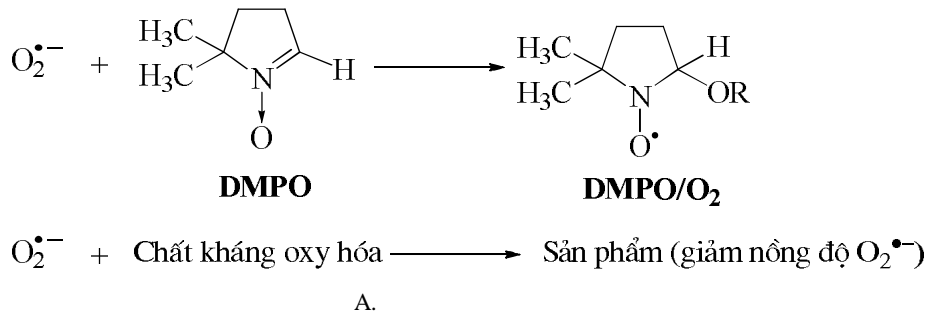
Hình 2. Hiệu quả phục hồi kiểu hình mắt nhám về trạng thái bình thường của cao chiết và bột nghiền rau sam. Kết quả thể hiện độ trung bình \pm S.E.M của ba nghiệm thức độc lập, *, $P < 0,05$

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa *in vitro* bằng hệ thống HPLC-ESR

Nguyên tắc khảo sát kháng oxy hóa HPLC-ESR dựa trên tín hiệu quang phổ ghi nhận từ phản ứng của thuốc thử DMPO và O_2^- . Sự kết hợp của gốc tự do (O_2^-) với DMPO tạo thành DMPO/ O_2 được phát hiện ở bước sóng 254 nm. Khi có chất kháng oxy hóa, chất kháng oxy hóa sẽ kết hợp với gốc tự do (O_2^-), nên số lượng gốc tự do còn lại kết hợp với DMPO tạo thành DMPO/ O_2 sẽ giảm. Sự giảm tín hiệu của phản ứng chứng minh sự hiện diện của chất kháng oxy hóa hiện diện trong phản ứng. Dựa vào tín hiệu này xác định được hoạt chất kháng oxy hóa của

cao chiết [9]. Phản ứng giữa thuốc thử với gốc tự do, và gốc tự do với chất kháng oxy hóa được trình bày như Hình 3A.

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của cao chiết được trình bày trong Hình 3B. Tín hiệu của sản phẩm DMPO/ O_2 (đường gợn sóng) cho thấy ở những vị trí không có chất kháng oxy hóa của cao chiết thì hiệu suất phản ứng là 100 %. Dịch trích rau sam qua hệ thống HPLC-ESR được ghi nhận tín hiệu có hai đỉnh phân đoạn, được phân tách rõ nhất ở khoảng thời gian từ 7 đến 13 phút trong thời gian lưu giữ của pha phản ứng từ 0 đến 25 phút. Tương ứng với phân đoạn cao chiết ở khoảng thời gian lưu giữ từ 7 đến 10 phút cho thấy tín hiệu quang phổ của sản phẩm DMPO/ O_2 giảm mạnh từ 100 % còn 80 %, trong đó ngay tại đỉnh (1) của phân đoạn cao chiết tín hiệu của DMPO/ O_2 (1') giảm nhiều nhất, chứng tỏ phân đoạn cao chiết (1) có nồng độ chất kháng oxy hóa cao. Vị trí xuất hiện của phân đoạn có thời gian lưu giữ từ 11 đến 13 phút (đỉnh 2) cho thấy dấu hiệu của DMPO/ O_2 (2') giảm nhẹ so với nồng độ sản phẩm ban đầu, nồng độ chất kháng oxy hóa ở phân đoạn (2) ở mức thấp hơn phân đoạn (1). Ở $R_f > 13$, tín hiệu DMPO/ O_2 trở lại ở mức 100 % chứng tỏ rau sam có hai phân đoạn ức chế sự hình thành sản phẩm của gốc tự do và thuốc thử DMPO. Phân đoạn cao chiết ở độ lưu giữ R_f 7 đến R_f 13 làm giảm tín hiệu của sản phẩm DMPO/ O_2 cho thấy những phân đoạn này của cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa. Ở phân đoạn R_f 10, ngay tại vị trí cao nhất của đỉnh phân đoạn (1) chứa hoạt chất kháng oxy hóa cao nhất làm giảm thấp nhất lượng sản phẩm DMPO/ O_2 , phân đoạn này chứa hoạt chất kháng oxy hóa tối ưu nhất trong các phân đoạn của cao chiết rau sam.

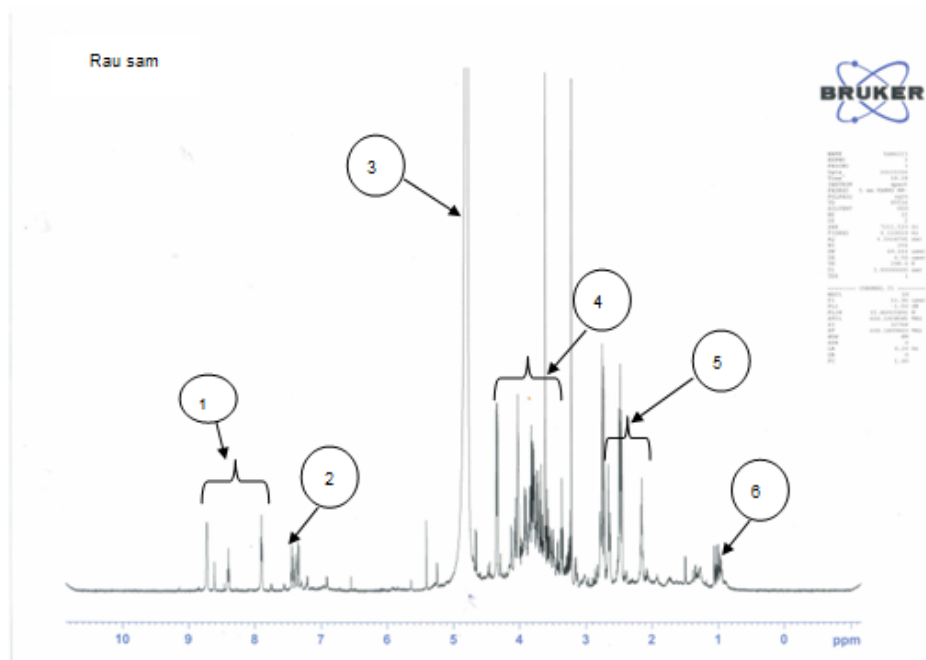


Hình 3. Kết quả phân tích khả năng kháng oxy hóa của rau sam bằng HPLC-ESR. (A) Sự kết hợp DMPO/ O_2 với gốc tự do và chất kháng oxy hóa; (B) tín hiệu chất kháng oxy hóa kết hợp với gốc tự do

Phân tích thành phần cao chiết rau sam

Tín hiệu cao chiết được ghi nhận ở các tần số khác nhau (Hình 3) tương ứng với thành phần hóa học có trong cao chiết. Tín hiệu (1) tương ứng với các nhóm hợp chất flavonoid, tín hiệu (2) thể hiện cho các cấu trúc có chứa vòng thơm. Tín

hiệu (3) phân đoạn nước của cao chiết, tín hiệu (4) chủ yếu là đường và các hợp chất glycoside, (5) acid amino và (6) acid béo [16]. Thành phần hóa học chính của cao chiết rau sam là đường và các nhóm hợp chất vòng thơm.



Hình 4. Thành phần các hợp chất có trong cao chiết rau sam

KẾT LUẬN

Rau sam (*Portulaca oleracea* L.) có hoạt tính kháng oxy hóa cao nên giúp phục hồi kiểu hình mắt nhắm ở ruồi giấm biến đổi gen *hDuoX2* (GMR-GAL4/UAS-*hDuoX2*). Khả năng khôi phục kiểu hình mắt nhắm thành mắt hoang dại (bình thường) lần lượt là $81,72 \pm 6,11$ và $87,33 \pm 4,08$ khi bổ sung 20 % (v/v) bột nghiền hoặc cao chiết rau sam vào thức ăn ruồi thí nghiệm.

Phân tích khả năng oxy hóa của cao chiết rau sam trên hệ thống HPLC-ESR làm giảm 20 % tín hiệu của thuốc thử phát hiện gốc tự do DMPO chứng tỏ có sự hiện diện của hợp chất kháng oxy hóa.

Cao chiết với dung môi nước của rau sam cũng đã được phân tích có chứa các thành phần như: flavonoid, hợp chất nhân thơm (chưa xác định rõ thành phần), acid béo và acid amin. Tuy nhiên cần phân tích thêm để xác định cụ thể nhóm hợp chất nhân thơm trong thành phần cao chiết của rau sam.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn GS. Kamei Kaeko Viện Công nghệ Kyoto-Nhật Bản và Trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí và phương tiện thực hiện nghiên cứu.

Study on the antioxidant activity of *Portulaca oleracea* L. *in vitro* by HPLC-ESR and *in vivo* on transgenic *Drosophila melanogaster* model

- **Dai Thi Xuan Trang**
- **Truong Thi Phuong Thao**
Can Tho University
- **Kaeko Kamei**
Kyoto Institute of Technology, Japan

ABSTRACT

A study *in vitro* on the antioxidant activity of *Portulaca oleracea* L. was carried out by HPLC-ESR Spin-trapping System. HPLC-ESR analysis is performed on monitoring ESR signal intensity of radicals adduct of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO/O₂). The ESR signal which is recorded from the *Portulaca oleracea* L. extracts in aqueous buffer by HPLC-ESR system showed that the high antioxidant activity of the extracts reduce the concentration of DMPO/O₂ signal to 80 % and the absorbance of reactive oxygen species from 0.08 to 0.06. The ground powder and the extract of *Portulaca oleracea* were *in vivo* performed on GMR-GAL4/UAS-hDuox2 flies containing hDuox2 protein which induced high oxidative stress

Key words: antioxidant, DMPO, GMR-GAL4/UAS-hDuox2, HPLC-ESR, *Portulaca oleracea* L.

and expressed rough-eye phenotype. Antioxidant activities of *Portulaca oleracea* were evaluated by comparing the rough-eye area before and after the experiment. At the concentration of 20 %, the ground powder and the extracts induced antioxidant activities to 81.72 % and 87.33 %, respectively. The result showed that both the ground powder and the extracts had antioxidant activities which reduced symptoms of rough-eye phenotypes. In conclusion, the *in vitro* and *in vivo* experiments indicated that both ground powder and aqueous extract of leaves of *Portulaca oleracea* possess effective antioxidative abilities.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Behl, Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease, *Cell and Tissue Research*, 290, 3, 471-80 (1997)
- [2]. R.J. Reiter, Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain, *FASEB Journal*, 9, 7, 526-533 (1995)
- [3]. N. Houstis, E.D. Rosen, E.S. Lander, Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, *Nature*, 440, 7086, 944-8 (2006)
- [4]. A.G. Agbor, Y.J. Ngogang, Toxicity of herbal preparations, *Cam. J. Ethnobot*, 1, 23-28 (2005)

- [5]. N. Hermans, P. Cos, L. Maes, T. De Bruyne, D.V. Berghe, A.J. Vlietinck, L. Pieters, Challenges and pitfalls in antioxidant research, *Current Medicinal Chemistry*, 14, 417-430 (2007)
- [6]. P. Cos, N. Hermans, M. Calomme, L. Maes, T. De Bruyne, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe, Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55, 1291 (2003)
- [7]. N.T.T. Anh, M. Nishitani, S. Harada, M. Yamaguchi, K. Kamei, A *Drosophila* model for the screening of bioavailable NADPH oxidase inhibitors and antioxidants, *Mol. Cell. Biochem*, 352, 1-2, 91-98 (2011)
- [8]. S.D. Sanja, N.R. Sheth, N.K. Patel, D. Patel, B. Patel, Characterization and evaluation of antioxidant activity of *Portulaca oleracea*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1, 74-84 (2009)
- [9]. S. Yasuhiro, *et al.*, Development of a HPLC-ESR Spin-trapping system for post-column on-line detection of superoxide radical scavenging ability of column eluates, *Chemistry Letters*, 38, 7 (2009)
- [10]. N. Pfarr, E. Korsch, S. Kaspers, A. Herbst, A. Stach, C. Zimmer, J. Pohlenz, Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65, 6, 810-5 (2006)
- [11]. C. Guichard *et al.*, NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes?, *Biochem. Soc. Trans.*, 36, 5, 920-9 (2008)
- [12]. G.R. Drummond. *et al.*, Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 10, 6, 453-71 (2011)
- [13]. J. Pachucki, D. Wang, D. Christophe, F. Miot, Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions, *Mol Cell Endocrinol*, 214, 1-2, 53-62 (2004)
- [14]. P.H. Hộ, Cây cỏ Việt Nam, *Nhà xuất bản Trẻ*, Tp. HCM, Việt Nam (1999)
- [15]. P. Nevřelová, H. Kolářová, R. Bajgar, J. Maceček, M. Tomečka, K. Tománková, M. Strnad, Measurement of reactive oxygen species after photodynamic therapy *in vitro*, *Scripta Medica (BRNO)*, 78, 5, 281-290 (2005)
- [16]. P. Krishnan, N.J. Kruger, R.G. Ratcliffe, Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR, *Journal of Experimental Botany*, 56, 410 (2004)