

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME THỦY PHÂN TINH BỘT VÀ BẮT GỐC TỰ DO CỦA CAO CHIẾT RAU CÀNG CUA

Đỗ Nguyễn Anh Thư^(1,2), Võ Thanh Sang⁽²⁾, Ngô Đại Hùng⁽³⁾

(1) Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(2) Trường Đại học Nguyễn Tất Thành; (3) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài: 30/7/2021; Ngày gửi phản biện: 03/8/2021; Chấp nhận đăng: 30/9/2021

Liên hệ Email: vtsang@ntt.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2021.05.233>

Tóm tắt

Rau càng cua (*Peperomia pellucida*) được sử dụng rộng rãi như là một món ăn và là một bài thuốc trong điều trị phế nhiệt, viêm họng hoặc khô cổ khản tiếng, đái tháo đường, đau lưng, thiếu máu, mụn nhọt... Việc nghiên cứu về hoạt tính sinh học của rau càng cua là điều cần thiết nhằm làm rõ giá trị dược tính của nó. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng đái tháo đường và kháng oxy hóa tiềm năng của cao chiết ethanol rau càng cua đã được khảo sát. Hoạt tính kháng đái tháo đường được khảo sát thông qua khả năng ức chế hoạt động thủy phân tinh bột của các enzyme như α -amylase và α -glucosidase. Trong khi đó, hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát thông qua bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺. Kết quả khảo sát cho thấy rằng cao chiết rau càng cua có thể ức chế hoạt động thủy phân của enzyme α -amylase và α -glucosidase tại các giá trị IC₅₀ lần lượt là $(289 \pm 7)\mu\text{g/ml}$ và $(243 \pm 14)\mu\text{g/ml}$. Thêm vào đó, cao chiết rau càng cua cũng có khả năng bắt gốc tự do DPPH và ABTS⁺ tại các giá trị IC₅₀ lần lượt là $(144 \pm 3)\mu\text{g/ml}$ và $(131 \pm 4)\mu\text{g/ml}$. Với các kết quả đạt được trên, rau càng cua được xem là nguồn dược có tiềm năng trong việc phát triển sản phẩm giúp ổn định đường huyết và bảo vệ sức khỏe.

Từ khóa: rau càng cua, kháng oxy hóa, đái tháo đường, DPPH, α – amylase

Abstract

INVESTIGATION OF STARCH-HYDROLYZING ENZYME INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPEROMIA PELLUCIDA EXTRACT

Peperomia pellucida has commonly used as a vegetable as well as a traditional medicine in Vietnam. Up to now, the scientific reports due to biological activities of *P. pellucida* are still limited. This study therefore investigated potential anti-diabetic and antioxidant activities of ethanol extract of *P. pellucida*. The anti-diabetic activity was investigated via examining inhibitory effect of *P. pellucida* extract on starch-hydrolyzing enzymes (α -amylase and α -glucosidase). Moreover, the antioxidant activity of this extract was investigated via scavenging free radicals including DPPH and ABTS⁺. The results showed that *P. pellucida* extract was able to inhibit α –

amylase and alpha-glucosidase at IC₅₀ values of (289 ± 7)µg/ml and (243 ± 14)µg/ml, respectively. On the other hand, P. pellucida extract was found to be effective in scavenging DPPH and ABTS+radicals at IC₅₀ values of (144 ± 3)µg/ml and (131 ± 5)µg/ml. Accordingly, P. pellucida is considered as a potential material for development of health beneficial product with anti – diabetic and antioxidant effects.

1. Giới thiệu

Rau càng cua là loài thân thảo mọc nước, thuộc họ Hồ tiêu (Piperaceae), phân bố ở khu vực khí hậu nhiệt đới và thường mọc hoang dại ở nhiều nơi. Rau được sử dụng để ăn sống, có vị hơi chua, giòn ngon và có giá trị về dinh dưỡng. Các bộ phận của rau có chứa các hợp chất như carotenoids, alkaloids, saponins, tannins, glucosides, flavonoids, pellucidine A, peperomines A, B, C và E, sắt, kali, magiê, và vitamin C. Rau càng cua được dùng làm thuốc chống sốt rét, nhức đầu, thương tích, bỏng, đau dạ dày, hạ huyết áp, viêm họng, viêm ruột thừa, viêm gan truyền nhiễm (Alves và cs., 2019). Nhiều nghiên cứu khoa học về dược tính của rau càng cua cũng được công bố trong thời gian qua. Đáng chú ý, Oloyede và cộng sự (2011) đã chứng minh rằng rau càng cua có hoạt tính kháng oxy hóa rất hiệu quả. Rau càng cua ở các nồng độ 100µg/ml và 200µg/ml có thể làm giảm 97,9% và 98,6% gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), cao hơn so với ascorbic acid (90,9% và 68,7%), butylated hydroxyanisole (BHA) (95,4% và 94,3%) và alpha-tocopherol (15,4% và 12,4%) ở cùng nồng độ (Oloyede và cs., 2011). Tương tự, chiết xuất ethyl acetate và methanol của rau càng cua có thể bắt gốc DPPH tại các giá trị IC₅₀ lần lượt là 74µg/ml (Phongtongpasuk và cs., 2014) và 83µg/ml (Mutee và cs., 2010). Đặc biệt, một số nghiên cứu khác cũng cho thấy được hoạt tính kháng đái tháo đường của rau càng cua. Chuột được cho ăn ở chế độ có bổ sung P. pellucida 10% và 20% có thể làm giảm 64% và 68% đường huyết so với nhóm chứng âm được cho ăn bằng nước, trong khi nhóm chứng dương có dùng thuốc thương mại là glibenclamide (600µg/kg thể trọng) làm giảm 62% (Hamzah và cs., 2012). Hợp chất 8,9-dimethoxy ellagic acid được phân lập từ ethyl acetate từ lá của rau càng cua có thể làm giảm 33,7% lượng đường huyết ở chuột tiểu đường do alloxan gây ra so với nhóm chứng âm (Susilawati và cs., 2017). Mặc dù các hoạt tính kháng oxy hóa và kháng đái tháo đường của rau càng cua đã được công bố trên thế giới, nhưng việc đánh giá hoạt tính sinh học của nó ở Việt Nam vẫn chưa được thực hiện. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát sơ bộ hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng đái tháo đường của rau càng cua trên mô hình thí nghiệm in vitro.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Rau càng cua được thu mua ở cửa hàng rau sạch tại chợ Tân Mỹ, phường Bình Thuận, Quận 7, thành phố Hồ Chí Minh. Ethanol sử dụng trong nghiên cứu có nguồn

gốc từ công ty Xilong, Trung Quốc. Tất cả các hóa chất khác được mua từ công ty Sigma – Aldrich, Mỹ.

2.2. Phương pháp tách chiết

Rau càng cua được sấy ở tủ sấy hoàn lưu 60°C và được xay thành bột trước khi được ngâm với ethanol 96 độ theo tỷ lệ ngâm 1/8 (g/ml) tại nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc và cô quay đuổi hết dung môi. Cao chiết được sấy ở 60°C đến khi đạt độ ẩm 12% thì được lưu trữ ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Ước chế enzyme alpha – amylase

Thí nghiệm được thực hiện dựa vào thuốc thử dinitrosalicylic acid (DNS) như được mô tả bởi Bhutkar và Bhise (2012). Hỗn hợp phản ứng gồm 1ml dịch cao chiết ở các nồng độ khác nhau và 1ml alpha – amylase được ủ trong 30 phút ở 37°C. Hỗn hợp sau đó được cho thêm 1ml dung dịch tinh bột (1% w/v) và được ủ thêm 10 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách cho thêm 1ml DNS và đun sôi trong bể nhiệt 5 phút. Acarbose được sử dụng như là chứng dương. Mật độ quang của hỗn hợp phản ứng được đo ở 540nm. Phần trăm ước chế alpha-amylase được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ước chế} = [(ODc - ODs)/ODc] \times 100\%$$

Trong đó, ODc là mật độ quang của hỗn hợp phản ứng không có cao chiết và ODs là mật độ quang của hỗn hợp phản ứng có cao chiết.

2.4. Ước chế enzyme alpha – glucosidase

Hoạt tính ước chế alpha – glucosidase của cao chiết rau càng cua được thực hiện theo Shai và cộng sự (2012). Hút 20μl dịch cao chiết ở các nồng độ khác nhau cho vào microplates đã chứa sẵn 50μl đệm phosphate, cho thêm 20μl p-NPG 5mM, đem ủ ở nhiệt độ 37°C trong 15 phút. Sau đó cho 10μl enzyme alpha – glucosidase nồng độ 0,15U vào, tiếp tục ủ ở 37°C trong 15 phút. Cuối cùng, cho 100μl Na₂CO₃ 0,1M vào và đo mức độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 405nm. Hoạt tính ước chế của mẫu được xác định theo công thức:

$$\% \text{ ước chế} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

Trong đó: As: độ hấp thu của mẫu cao chiết hoặc đối chứng dương; Ac: độ hấp thu của mẫu chứng âm (có enzyme và cơ chất p-NPG mà không có mẫu thử).

2.5. Khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của cao chiết rau càng cua được thực hiện theo Loegel và cộng sự (2011). Trộn 0,1ml dịch cao chiết ở các nồng độ khác nhau với 0,1ml dung dịch DPPH (3mM) rồi ủ 30 phút trong tối trước khi đo mật độ quang ở 517nm. Tỷ lệ bắt gốc DPPH được tính theo công thức:

$$DPPH (\%) = [(ODc - ODm)/ODc] \times 100$$

Trong đó, ODc là giá trị mật độ quang của nhóm chứng và ODm là của nhóm mẫu thử.

2.6. Khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS+

Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+ của cao chiết rau càng cua được thực hiện theo Loegel và cộng sự (2011). Chuẩn bị dung dịch ABTS+ như sau: trộn dung dịch K₂S₂O₈ 7mM với ABTS 2,45mM theo tỷ lệ 1:1 và ủ trong tối từ 14 đến 16 giờ. Hỗn hợp được pha loãng với ethanol để đạt được mật độ quang khoảng $0,700 \pm 0,002$ tại 734nm. Trộn đều 0,9ml dung dịch ABTS+ với 0,1ml dịch mẫu ở các nồng độ khác nhau trong 45 giây rồi ủ trong tối 15 phút trước khi đo mật độ quang tại 734nm. Tỷ lệ bắt gốc ABTS+ được tính theo công thức:

$$ABTS+ (\%) = [(ODc - ODM)/ODc] \times 100$$

Trong đó, ODc là giá trị mật độ quang của nhóm chứng và ODM là của nhóm mẫu thử.

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS. Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Sigma plot 2010.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Hoạt tính ức chế enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase

Alpha – amylase và alpha – glucosidase là những enzyme quan trọng tham gia vào quá trình thủy phân tinh bột trong hệ tiêu hóa, góp phần làm tăng hàm lượng glucose sau ăn. Việc làm chậm quá trình thủy phân tinh bột thông qua ức chế hoạt động của các enzyme trên sẽ góp phần làm giảm đường huyết sau ăn ở những bệnh nhân mắc chứng đái tháo đường (Mahmood 2016). Vì vậy, ức chế các enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase được xem là mục tiêu cho việc sàng lọc các sản phẩm thiên nhiên có hoạt tính kháng đái tháo đường. Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế của cao chiết rau càng cua đối với hoạt động của enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase được khảo sát. Kết quả khảo sát cho thấy cao chiết rau càng cua có thể ức chế hoạt động thủy phân của các enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase. Hoạt tính ức chế phụ thuộc vào nồng độ cao chiết và đạt được giá trị IC₅₀ là 289µg/ml đối với enzyme alpha – amylase và 243µg/ml đối với enzyme alpha – glucosidase (Bảng 1 và 2). Hoạt tính ức chế enzyme alpha – glucosidase của cao chiết rau càng cua cao hơn so với enzyme alpha – amylase. Kết quả còn cho thấy rằng hoạt tính ức chế của rau càng cua thấp hơn so với acarbose. Acarbose ức chế enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase tại các giá trị IC₅₀ lần lượt là 141µg/ml và 114µg/ml. Tuy nhiên, hoạt tính ức chế của rau càng cua lại gần như tương đương với khổ qua rừng *Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser (IC₅₀ = 270µg/ml) (Pham và cs., 2019). Như vậy, rau càng cua cũng được xem là nguyên liệu tiềm năng có thể dùng trong các bài thuốc có tác dụng làm giảm đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế enzyme α – amylase của cao chiết rau càng cua

	Cao chiết rau càng cua					Acarbose				
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	0	50	100	200	400	0	25	50	100	200
% ức chế	0	13	24	39	65	0	7	21	49	64
Phương trình hồi quy	$y = 0,157x + 4,5645$					$y = 0,3305x + 3,3733$				
IC ₅₀	$289 \pm 7 \mu\text{g/ml}$					$141 \pm 9 \mu\text{g/ml}$				

Bảng 2. Hoạt tính ức chế enzyme α – glucosidase của cao chiết rau càng cua

	Cao chiết rau càng cua					Acarbose				
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	0	50	100	200	400	0	25	50	100	200
% ức chế	0	8	22	54	75	0	14	26	53	80
Phương trình hồi quy	$y = 0,1961x + 2,3492$					$y = 0,3972x + 4,6528$				
IC ₅₀	$243 \pm 14 \mu\text{g/ml}$					$114 \pm 10 \mu\text{g/ml}$				

3.2 Kết quả khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do của cao chiết rau càng cua

Trong cơ thể sinh vật, hàm lượng gốc tự do sinh ra nhiều trong các quá trình chuyển hóa có thể gây tổn thương các đại phân tử sinh học như DNA, protein, và lipid của tế bào, từ đó gián tiếp gây ra nhiều rối loạn sinh lý và bệnh lý nghiêm trọng khác nhau (Asmat và cs., 2016). Đặc biệt, gốc oxy hóa cũng được cho là góp phần gây ra các biến chứng ở bệnh nhân đái tháo đường (Rahimi – Madiseh và cs., 2016). Vì vậy, các sản phẩm thiên nhiên có khả năng kháng oxy hóa có thể góp phần đáng kể trong việc ngăn chặn bệnh, trong đó có bệnh đái tháo đường (Zatalia và cs., 2013). Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết rau càng cua cũng được khảo sát thông qua phương pháp bắt gốc tự do DPPH và ABTS+ (Bảng 3 và 4). Kết quả khảo sát cho thấy cao chiết rau càng cua có thể bắt gốc tự do DPPH và ABTS+ tại các giá trị IC₅₀ lần lượt là 144 $\mu\text{g/ml}$ và 131 $\mu\text{g/ml}$. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và ABTS+ của rau càng cua thấp hơn so với vitamin C khoảng 7 lần, và thấp hơn 2 lần so với cao chiết rau càng cua ở Thái Lan (IC₅₀ = 74 $\mu\text{g/ml}$) (Phongtongpasuk và cs., 2014) và Malaysia (83 $\mu\text{g/ml}$) (Mutee và cs., 2010). Tuy nhiên, hoạt tính bắt gốc tự do của rau càng cua được nhận thấy là cao hơn so với rau khổ qua rừng (IC₅₀ = 430 $\mu\text{g/ml}$) (Pham và cs., 2019). Với khả năng bắt gốc tự do như thế, rau càng cua cũng có thể góp phần hạn chế tác hại do gốc oxy hóa gây ra.

Bảng 3. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của cao chiết rau càng cua

	Cao chiết rau càng cua					Vitamin C					
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	0	25	50	100	200	0	5	10	15	20	25
% bắt gốc tự do	0	8	16	46	64	0	12	23	36	52	67
Phương trình hồi quy	$y = 0,3361x + 1,5643$					$y = 2,6654x - 1,6529$					
IC ₅₀	$144 \pm 3 \mu\text{g/ml}$					$19 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$					

Bảng 4. Hoạt tính bắt gốc tự do ABTS+ của cao chiết rau càng cua

	Cao chiết rau càng cua					Vitamin C					
Nồng độ (µg/ml)	0	25	50	100	200	0	5	10	15	20	25
% bắt gốc tự do	0	9	28	49	68	0	14	32	45	49	66
Phương trình hồi quy	$y = 0,3446x + 4,9353$					$y = 2,5564x + 2,4674$					
IC ₅₀	131 ± 4 µg/ml					18 ± 0,1 µg/ml					

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, cao chiết rau càng cua đã được chứng minh là có thể ức chế hoạt động thủy phân của các enzyme alpha – amylase và alpha – glucosidase và bắt gốc tự do DPPH và ABTS+. Điều đó cho thấy việc sử dụng rau càng cua có thể góp phần làm giảm đường huyết và ngăn chặn các tác hại do gốc oxy hóa gây ra ở bệnh nhân đái tháo đường. Tuy nhiên, việc đánh giá thành phần hóa học và hoạt tính kháng đái tháo đường của rau càng cua cần được mở rộng nghiên cứu thêm nhằm tạo cơ sở khoa học cho việc phát triển các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ chữa trị bệnh đái tháo đường.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST và Quỹ phát triển khoa học và công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, dưới mã số: 2021.01.33.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Alves, N. S., Setzer, W., da Silva, J. K. D. (2019). The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. *J. Ethnopharmacol*, 232, 90-102.
- [2] Asmat, U., Abad, K., Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharm. J*, 24, 547-553.
- [3] Bhutkar, M. A., Bhise, S. B. (2012). In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Int. J. Chem. Sci*, 10, 457-462.
- [4] Hamzah, R. U., Odetola, A. A., Erukainure, O. L., Oyagbemi, A. A. (2012). *Peperomia pellucida* in diets modulates hyperglycemia, oxidative stress and dyslipidemia in diabetic rats. *J. Acute Dis*, 1, 135-140.
- [5] Loegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal*, 24, 1043-1048.
- [6] Mahmood, N. (2016). A review of α-amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comp. Clin. Path*, 25, 1253-1264.

- [7] Mutee, A. F., Salhimi, S. M., Yam, M. F., Lim, C. P., Abdullah, G. Z., Ameer, O. Z., Abdulkarim, M. F., Asmawi, M. Z. (2010). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of *Peperomia pellucida*. *Int. J. Pharmacol*, 6, 686-690.
- [8] Oloyede, G. K., Onocha, P. A., Olaniran, B. B. (2011). Phytochemical, toxicity, antimicrobial and antioxidant screening of leaf extracts of *Peperomia pellucida* from Nigeria. *Adv. Environ. Biol*, 5, 3700-3709.
- [9] Pham, T. M. H., Ngo, D. H., Ngo, D. N., Vo, T. S. (2019). Investigation of biological activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser.). *Biomolecules*, 9, 1-10.
- [10] Phongtongpasuk, S., Poadang, S. (2014). Extraction of antioxidants from *Peperomia pellucida* L. Kunth. Thammasat. *Int. J. Sci. Technol*, 19, 38-43.
- [11] Rahimi-Madiseh, M., Malekpour-Tehrani, A., Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M. (2016). The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pac. J. Trop. Med*, 9, 825-831.
- [12] Shai, L. J., Magano, S. R., Lebelo, S. L., Mogale, A. M. (2011). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *J. Med. Plant Res*, 5, 2863-2867.
- [13] Susilawati, Y., Nugraha, R., Krishnan, J., Muhtadi, A., Sutardjo, S., Supratman, U. (2017). A new antidiabetic compound 8, 9-dimethoxy ellagic acid from sasaladaan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 8, 269-274.
- [14] Zatalia, S. R., Sanusi, H. (2013). The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. *Acta. Med. Indones*, 45, 141-147.