

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α -AMYLASE và α -GLUCOSIDASE CỦA MỘT SỐ CÂY THUỐC DÂN GIAN TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

SCREENING α -AMYLASE AND α -GLUCOSIDASE INHIBITOR ACTIVITIES OF TRADITIONAL MEDICINAL PLANTS IN DIABETES TREATMENT

Lê Quốc Duy¹

Nguyễn Minh Chơn²

Nguyễn Phạm Tuấn³

Tóm tắt

Đề tài “Khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của một số cây thuốc dân gian điều trị bệnh đái tháo đường” được thực hiện nhằm mục tiêu tuyển chọn các cây dược liệu trị đái tháo đường hiệu quả có nguồn gốc thiên nhiên, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi để người bệnh và thầy thuốc có thêm lựa chọn. Kết quả phân tích định tính cho thấy, cao ethanol từ các mẫu lá chứa các hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin và saponin. Cao ethanol từ các mẫu lá có khả năng ức chế enzyme α -amylase: lá ổi (IC50 = 42,92 μ g/mL); lá xoài (IC50 = 66,17 μ g/mL), lá măng cầu ta (IC50 = 64,85 μ g/mL), lá măng cầu Xiêm (IC50 = 76,35 μ g/mL) và lá bình bát (IC50 = 88,93 μ g/mL). Đồng thời, cao ethanol từ các mẫu lá cũng ức chế hoạt tính của enzyme α -glucosidase: lá bình bát (IC50 = 18,18 μ g/mL), lá xoài (IC50 = 33,18 μ g/mL), lá măng cầu Xiêm (IC50 = 45,49 μ g/mL), lá măng cầu ta (IC50 = 55,73 μ g/mL) và lá ổi (IC50 = 97,47 μ g/mL). Phân tích hiệu quả khử gốc tự do cho thấy, cao ethanol từ các mẫu lá có khả năng khử gốc tự do DPPH: lá bình bát (IC50 = 285,11 μ g/mL), lá măng cầu ta (IC50 = 267,61 μ g/mL), lá ổi (IC50 = 244,96 μ g/mL), lá xoài (IC50 = 241,79 μ g/mL) và lá măng cầu Xiêm (IC50 = 223,12 μ g/mL).

Từ khóa: α -amylase, α -glucosidase, DPPH, lá măng cầu Xiêm, lá ổi, lá xoài, lá bình bát và lá măng cầu ta.

1. Mở đầu

Đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh do sự rối loạn chuyển hóa carbohydrate khi hormone insulin của tuyến tụy bị thiếu hay giảm tác động trong cơ thể. ĐTĐ biểu hiện bằng lượng glucose trong

¹ Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³ Sở Khoa học và Công nghệ An Giang

Abstract

Topic “Screening α -amylase and α -glucosidase Inhibitor Activities of Traditional Medicinal Plants Diabetes Treatment” is carried out with the aim to select the herbs in diabetes treatment efficiently, which have natural origin since they cost cheap and offer more options for patients and doctors. The qualitative analysis showed that ethanol extracts of leaf contain alkaloids, flavonoids, tannins and saponins. Ethanol extracts of leaf exhibited the inhibitory ability to enzyme α -amylase: *Psidium guajava* leaf (IC50 = 42,94 μ g/mL); *Mangifera Indica* L. leaf (IC50 = 61,17 μ g/mL), *Annona squamosa* leaf (IC50 = 64,85 μ g/mL), *Annona muricata* L. leaf (IC50 = 76,25 μ g/mL) and *Annona reticulata* leaf (IC50 = 88,93 μ g/mL). Meanwhile, ethanol extracts from leaf also exhibited the inhibitory activity to enzyme α -glucosidase: *Annona reticulata* leaf (IC50 = 18,18 μ g/mL), *Mangifera Indica* L. leaf (IC50 = 33,18 μ g/mL), *Annona muricata* L. leaf (IC50 = 45,49 μ g/mL), *Annona squamosa* leaf (IC50 = 55,73 μ g/mL) and *Psidium guajava* leaf (IC50 = 97,47 μ g/mL). The antioxidant activity analysis showed that ethanol extracts from leaf could reduce free radicals DPPH: *Annona reticulata* leaf (IC50 = 285,11 μ g/mL), *Annona squamosa* leaf (IC50 = 267,61 μ g/mL), *Psidium guajava* leaf (IC50 = 244,96 μ g/mL), *Mangifera Indica* L. leaf (IC50 = 241,79 μ g/mL) và *Annona muricata* L. leaf (IC50 = 223,12 μ g/mL).

Keywords: α -amylase, α -glucosidase, DPPH, *Annona muricata* L., *Annona squamosa*, *Annona reticulata*, *Psidium guajava*, *Mangifera Indica* L.

máu cao hơn bình thường. Do đó, việc kiểm soát lượng glucose là một mục tiêu quan trọng để làm giảm nguy cơ biến chứng sức khỏe lâu dài của bệnh ĐTĐ. Carbohydrate là nguồn cung ứng lớn glucose trong cơ thể. Phân tử carbohydrate bị thủy phân thành các oligosaccharide bởi enzyme α -amylase (tụy tạng); tiếp theo ở ruột non, enzyme α -glucosidase thủy phân oligosaccharide thành

glucose và sau đó thẩm thấu vào máu. Do đó, nếu ức chế được 2 enzyme này thì lượng glucose trong máu sẽ giảm, việc điều trị ĐTĐ sẽ dễ dàng hơn. ĐTĐ có thể trực tiếp hay gián tiếp gây các rối loạn như suy thận, thiếu máu tim, bệnh thần kinh,...

Hiện nay, ĐTĐ được kiểm soát bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng thuốc duy trì lượng glucose trong máu ổn định (Sulfonylurea), chất ức chế tiêu hóa và hấp thu tinh bột (Glucobay), thuốc cảm ứng độ nhạy của insulin. Các thuốc điều trị ĐTĐ thường có giá thành cao và nhiều tác dụng phụ như béo phì, vàng da, suy đường huyết,... gây nhiều khó khăn trong quá trình điều trị và chăm sóc bệnh nhân. Với xu hướng hiện nay trên thế giới và Việt Nam, nghiên cứu và phát triển các loại thuốc hạ đường huyết, có nguồn gốc thực vật được sử dụng phổ biến trong dân gian, nhằm tìm những loại thuốc mới hiệu quả và không gây tác dụng phụ so với các thuốc hóa dược là rất cần thiết. Đồng thời, tận dụng được nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi để người bệnh và thầy thuốc có thêm lựa chọn. Nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học về các cây dược liệu có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase như lá bằng lăng tím (Miura *et al.*, 2012), lá dâu tằm (Habeeb và cộng sự, 2012),... Chính vì vậy, để mở rộng phạm vi nghiên cứu khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cây cỏ Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “Khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của một số cây thuốc dân gian điều trị bệnh đái tháo đường”.

2. Phương tiện và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Lá măng cầu ta (*Annona squamosa*), măng cầu Xiêm (*Annona muricata L.*), bình bát (*Annona reticulata*), ôi (*Psidium guajava*) và xoài (*Mangifera Indica L.*) được thu hái ở tỉnh Trà Vinh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp trích cao chiết ethanol từ các mẫu lá: Các mẫu lá tươi xanh, sạch bệnh sau khi thu từ nhà vườn mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch, lau khô và bỏ phần cuống trái. Sau đó, các mẫu lá được cắt nhỏ thành các phần đều nhau và sấy ở điều kiện nhiệt độ 50°C, trong 72 giờ. Các mẫu lá sau khi sấy được cho vào túi vải, buộc kĩ, thực hiện ngâm dầm với ethanol 90%, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:10 (w/v). Tiến hành ngâm dầm các mẫu lá trong bình thủy tinh 10 lít, trong điều kiện nhiệt độ phòng, để trong tối và thời gian ngâm là 72 giờ. Sau đó, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc có đường kính 13 μ m, thu dịch lọc và bỏ phần bã. Dịch lọc được cô cạn bằng máy cô quay chân không để loại bỏ dung môi và thu được cao ethanol của các mẫu lá. Cao chiết ethanol của các mẫu lá được trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ -20°C và sử dụng cho các thí nghiệm sau.

2.2.1. Định tính một số hợp chất thiên nhiên trong cao chiết ethanol từ các mẫu lá

Tiến hành xác định một số hợp chất trong cao chiết ethanol của các mẫu lá theo phương pháp của Yadav và cộng sự. (2014) (Bảng 1).

Bảng 1: Định tính một số hợp chất thiên nhiên trong cao chiết ethanol từ các mẫu lá

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (Thuốc thử Mayer)	1 mL dịch trích + vài giọt thuốc thử Mayer	Kết tủa màu nâu
Flavonoid	1mL dịch trích + 2 mL Pb(OAc) ₄ 10%	Xuất hiện màu vàng
Phenolic	2,5 mL dịch trích + 5 mL H ₂ O + 1mL NH ₄ OH + 2,5 mL C ₅ H ₁₁ OH	Sau 30 phút, xuất hiện màu xanh lá và xanh dương
Saponin (Thuốc thử Foam)	3 mL dịch trích + 6 mL H ₂ O → đun nóng	Xuất hiện bọt
Steroid (Thuốc thử Salkowski)	1 mL dịch trích + 2 mL CHCl ₃ + 2 mL H ₂ SO ₄ đậm đặc	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin (Thuốc thử Braymer)	0,5 mL dịch trích + 10 mL H ₂ O + 2-3 giọt FeCl ₃ 0,1%	Kết tủa xanh dương đen

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -amylase

Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của enzyme α -amylase được thực hiện theo phương

pháp của Đái Thị Xuân Trang và cộng sự. (2012) có điều chỉnh như sau: cao ethanol được pha loãng thành các mức nồng độ: 20 - 100 (μ g/mL). Enzyme α -amylase pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 ở nồng độ 0,5 U/mL. Tinh bột (1 mg/mL).

50 µL enzyme α-amylase 0,5 U/mL được ủ với 100 µL cao chiết ở các mức nồng độ khác nhau và 100 µL dung dịch đệm phosphate pH = 7, ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Tiếp theo, cho vào hỗn hợp phản ứng 250 µL tinh bột 1 mg/mL và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào lần lượt 100 µL HCl 1N để dừng phản ứng và 300 µL thuốc thử Iodine 0,1N để nhận biết lượng tinh bột còn lại dựa trên phản ứng màu xanh đặc trưng của phức hợp tinh bột-iodine. Hỗn hợp được đo quang phổ (Thermo, Mỹ) ở bước sóng λ = 660 nm để xác định lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Song song, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzyme α-amylase với đối chứng dương là Acarbose ở các mức nồng độ tương ứng. Phần trăm enzyme α-amylase bị ức chế (%): dựa vào lượng tinh bột ban đầu và lượng tinh bột còn lại sau phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thụ quang phổ.

Phần trăm enzyme α-amylase bị ức chế (%) = 100 – Hiệu suất phản ứng (%)

Hiệu suất phản ứng (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$

Trong đó:

A₀: Giá trị quang của dung dịch đối chứng (lượng tinh bột ban đầu).

A₁: Giá trị quang của dung dịch sau phản ứng (lượng tinh bột còn lại).

Tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa % enzyme bị ức chế và nồng độ mẫu. Dựa vào phương trình đường chuẩn xác định được giá trị IC₅₀.

* **IC₅₀ và cách xác định:** IC₅₀ là một giá trị dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hoặc yếu của mẫu khảo sát. IC₅₀ được định nghĩa là nồng độ (mg/mL) của mẫu tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do, tế bào hoặc enzyme, mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC₅₀ càng thấp.

Xác định IC₅₀: Tiến hành khảo sát hoạt tính của mẫu ở nhiều nồng độ khác nhau. Với những mẫu có hoạt tính biến thiên tuyến tính với nồng độ cao chiết và chúng ta vẽ một đường chuẩn đường thẳng $y = ax + b$ qua tất cả các điểm (với y là % ức chế và x là nồng độ). Với những mẫu có hoạt tính không biến thiên tuyến tính với nồng độ, một cách gần đúng, chúng ta chọn hai nồng độ ức chế trên và dưới 50% và cũng tiến hành vẽ đường thẳng $y = ax + b$. Ta sẽ thu được phương trình $y = ax + b$ với hệ số a, b đã biết. Từ phương trình $y = ax + b$ đã

biết, thay y = 50% vào phương trình ta sẽ thu được giá trị x, đó chính là nồng độ ức chế được 50% gốc tự do (IC₅₀).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α-glucosidase

Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của enzyme α-glucosidase được thực hiện theo phương pháp của Đái Thị Xuân Trang và cộng sự. (2012) và có điều chỉnh như sau: cao ethanol từ các mẫu lá được pha loãng thành các mức nồng độ: 10, 25, 50, 75 và 100 (µg/mL). Enzyme α-glucosidase được pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 thành nồng độ 0,2 U/mL.

100 µL enzyme α-glucosidase được ủ với 50 µL cao chiết ở các mức nồng độ khác nhau ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Tiếp theo, cho vào hỗn hợp phản ứng 50 µL pNPG nồng độ 4mM và ủ ở nhiệt độ 37°C với thời gian 20 phút. Sau cùng, phản ứng được kết thúc bằng việc bổ sung 1000 µL Na₂CO₃ 0,2M. Hoạt động ức chế của enzyme α-glucosidase được xác định bằng cách đo quang phổ (Thermo, Mỹ) ở bước sóng λ = 405 nm. Song song, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzyme α-glucosidase với đối chứng dương là Acarbose ở các mức nồng độ tương ứng. Phần trăm enzyme α-glucosidase bị ức chế (%) được tính dựa vào lượng p-nitrophenol tạo thành từ pNPG trong phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thụ quang phổ.

Phần trăm enzyme α-glucosidase bị ức chế (%) = $(B - A) / B \times 100$

Trong đó:

A: Giá trị quang của mẫu thật.

B: Giá trị quang của mẫu đối chứng.

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol từ các mẫu lá

Phản ứng khử gốc tự do của cao chiết ethanol từ các mẫu lá bằng phương pháp DPPH được thực hiện theo phương pháp của Shirwaikar và cộng sự. (2006) và có điều chỉnh như sau: cao chiết của các mẫu lá được pha trong DMSO để được 50 - 300 µg/mL. DPPH được pha trong ethanol để được dung dịch gốc có nồng độ 0,2 mg/mL. Phản ứng được thực hiện với 500 µL cao chiết ở các nồng độ khác nhau được cho vào ống nghiệm, sau đó thêm vào mỗi ống nghiệm 500 µL DPPH và lắc đều. Các ống nghiệm được giữ ổn định trong tối, ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút, sau đó tiến hành đo

độ hấp thu quang phổ (Thermo, Mỹ) ở bước sóng $\lambda = 517$ nm. Vitamin C được thực hiện tương tự cao chiết, với 8 mức nồng độ là 0 - 70 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel, thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 16.0. Kiểm định sự khác biệt giữa các nghiệm thức theo phép thử LSD và Duncan.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định tính một số hợp chất thiên nhiên trong cao chiết ethanol từ các mẫu lá

Kết quả phân tích định tính cho thấy, trong cao chiết ethanol của các mẫu lá (mãng cầu Xiêm, măng cầu ta, bình bát, xoài và ôi) có sự hiện diện của các hợp chất như flavonoid, tannin, saponin và alkaloid (Bảng 2).

* Alkaloid: là các hợp chất hữu cơ trong thực vật có chứa một hay nhiều nguyên tử nitơ trong phân tử và có tính kiềm. Alkaloid có tác dụng sinh học rất đa dạng, chủ yếu alkaloid được sử dụng làm thuốc như ức chế hoặc kích thích thần kinh trung ương, điều trị bệnh tim, cao huyết áp, chống sốt rét, chống ung thư,... (Phan Quốc Kinh, 2011).

* Tannin: Tannin là nhóm duy nhất trong nhóm chất chuyển hóa phenolic với trọng lượng phân

tử từ 500-30.000 Dalton, được phân bố rộng rãi trong các thức ăn và đồ uống từ thực vật. Tannin có nhiều đặc tính sinh học cao như hiệu quả chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng virus, chống gây đột biến, chống ĐTĐ và ngăn ngừa bệnh mãn tính. Trong hiệu quả ức chế ĐTĐ, tannin có khả năng ức chế 2 enzyme α -amylase và α -glucosidase. Tannin có hoạt tính chống ĐTĐ bằng 2 cách: (i) làm giảm mức độ glucose bằng cách trì hoãn sự hấp thu glucose ở ruột và đóng vai trò như insulin; (ii) trì hoãn sự khởi đầu của bệnh ĐTĐ type 2 bằng việc điều tiết môi trường chống oxy hóa của tế bào β tuyến tụy (Serrano *et al.*, 2009).

* Saponin: dưới tác dụng của các enzyme thực vật, saponin bị thủy phân thành genin và glucid. Saponin cung cấp nhiều loại thuốc quan trọng với tác dụng bổ, tăng cường sinh lực (saponin có trong họ nhân sâm); tác dụng long đờm, dịu ho (có trong cam thảo, viễn chí); giảm đau nhức khớp xương, hạ cholesterol trong máu (Hoàng Sâm và cộng sự, 2009).

* Flavonoid: là chất có cấu tạo với khung stilben và khung flavonoid. Flavonoid được biết là chất có tác dụng hạ đường huyết và phục hồi tế bào β của tuyến tụy, kháng khuẩn và virus, thoái hóa thần kinh, chống oxy hóa,... (Gopinath và cộng sự, 2013).

Bảng 2: Kết quả phân tích một số hợp chất thiên nhiên trong cao chiết từ các mẫu lá

Nguyên liệu	Hợp chất	Hiện tượng	Kết quả
Lá măng cầu Xiêm	Tannin	Kết tủa xanh dương đen	+
Lá măng cầu ta	Tannin	Kết tủa xanh dương đen	+
	Flavonoid	Xuất hiện màu vàng	+
Lá bình bát	Alkaloid	Kết tủa màu nâu	+
	Tannin	Kết tủa xanh dương đen	+
	Tannin	Kết tủa xanh dương đen	+
Lá xoài	Flavonoid	Xuất hiện màu vàng	+
	Saponin	Xuất hiện bọt	+
	Tannin	Kết tủa xanh dương đen	+
Lá ôi	Flavonoid	Xuất hiện màu vàng	+
	Saponin	Xuất hiện bọt	+

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -amylase

Trong cơ thể, enzyme α -amylase có vai trò thủy phân các liên kết α -1,4-glucoside của tinh bột, glycogen và các polysaccharide khác tạo thành glucose và maltose. Enzyme α -amylase xúc tác thủy phân tinh bột tạo ra nhiều glucose, làm tăng lượng glucose trong máu dẫn đến nguy cơ dễ mắc

bệnh ĐTĐ. Do đó, ức chế α -amylase có thể được xem là một cơ chế để làm giảm glucose trong máu và hạn chế nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ. Các chất ức chế (Acarbose, Tannin) có tác động mạnh đến khả năng hoạt động của α -amylase bằng cách kim hãm theo hướng cạnh tranh hay phi cạnh tranh, kết quả làm ảnh hưởng đến sự liên kết giữa trung tâm hoạt động của enzyme với cơ chất. Vì vậy, Acarbose được sử dụng như nghiệm thức đối chứng trong

các nghiên cứu ức chế α -amylase.

Khi tăng nồng độ Acarbose từ 20-100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), phần trăm α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ Acarbose và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%. Cụ thể, ở nồng độ Acarbose 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, khả năng ức chế α -amylase đạt 53,03%; 39,04% ở nồng độ Acarbose 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và thấp nhất là 14,95% ở nồng độ Acarbose 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hình 1).

Khả năng ức chế α -amylase được tính dựa vào sự chênh lệch lượng tinh bột ban đầu và lượng tinh bột còn lại sau phản ứng thủy phân để đánh giá mức độ thủy phân của α -amylase. Lượng tinh bột còn lại sau phản ứng càng nhiều thì khả năng ức chế α -amylase càng mạnh. Kết quả, hiệu quả ức chế α -amylase tăng tuyến tính khi tăng nồng độ cao chiết và có sự khác biệt giữa các mẫu nguyên liệu. Cao chiết ethanol từ các mẫu lá cho hiệu quả ức chế α -amylase cao nhất ở mức nồng độ là 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cụ thể, hiệu quả ức chế α -amylase đạt 87,11% (lá ôi); 78,13% (lá măng cầu ta); 67,73% (lá xoài); 67,07% (lá măng cầu xiêm) và 56,20% (lá bình bát). Trong khi đó, hiệu quả ức chế α -amylase thấp nhất của cao chiết ethanol từ các mẫu lá ở nồng độ là 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$: lá ôi đạt 34,88%; lá xoài đạt 30,52%;

lá bình bát đạt 22,77%; lá măng cầu Xiêm đạt 19,52% và lá măng cầu ta đạt 15,49% (Hình 2).

Dựa vào kết quả phân tích khả năng ức chế enzyme α -amylase của các loại cao chiết ethanol, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α -amylase của các loại cao chiết ethanol giữa các nồng độ khác nhau. Kết quả vẽ được các phương trình đường thẳng như sau:

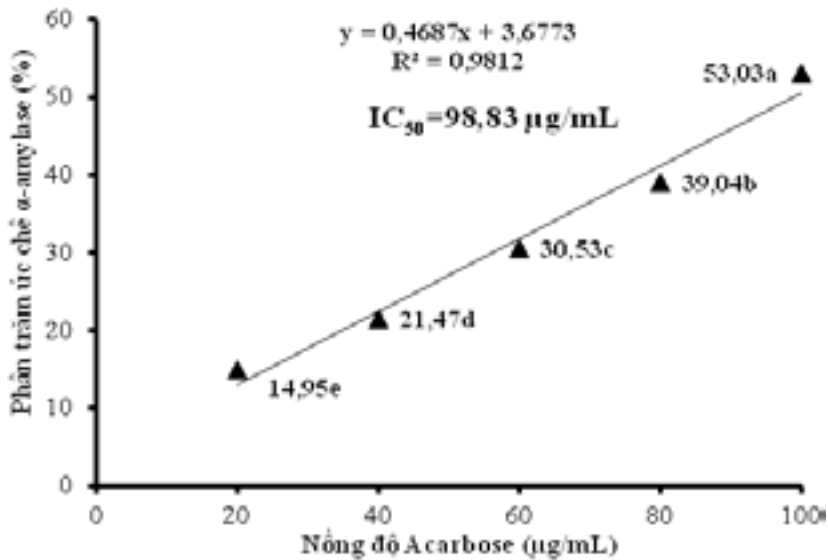
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu Xiêm là $y = 0,599x + 4,262$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9778$ và giá trị IC_{50} là 76,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu ta là $y = 0,785x - 1,1321$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,981$ và giá trị IC_{50} là 64,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

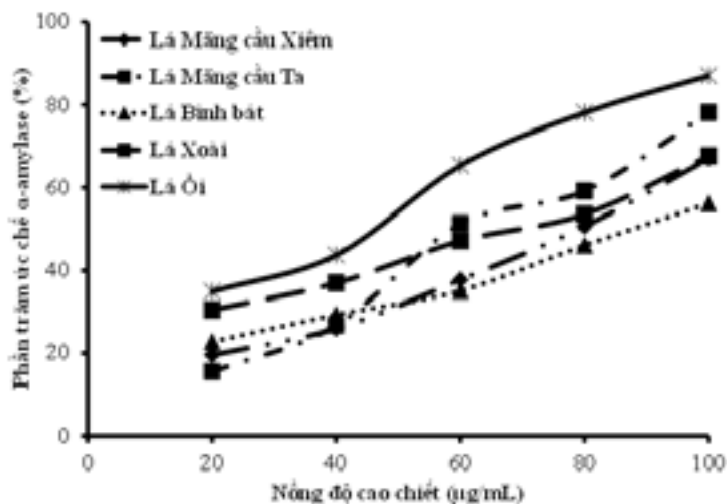
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá bình bát là $y = 0,4181x + 12,82$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9817$ và giá trị IC_{50} là 88,93 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá xoài là $y = 0,4554x + 19,865$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9805$ và giá trị IC_{50} là 66,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá ôi là $y = 0,6943x + 20,185$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,978$ và giá trị IC_{50} là 42,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Hình 1: Hiệu quả ức chế enzyme α -amylase của Acarbose



Hình 2: Hiệu quả ức chế enzyme α -amylase của các cao chiết ethanol

Hiệu quả ức chế α -amylase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá tốt hơn so với Acarbose, thể hiện qua giá trị IC_{50} của các mẫu cao chiết thấp hơn so với Acarbose. Cụ thể, hiệu quả khử α -amylase giảm dần theo thứ tự: lá ổi ($IC_{50} = 42,92 \mu\text{g/mL}$) > lá xoài ($IC_{50} = 66,17 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu ta ($IC_{50} = 64,85 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu Xiêm ($IC_{50} = 76,35 \mu\text{g/mL}$) > lá bình bát ($IC_{50} = 88,93 \mu\text{g/mL}$) > Acarbose ($IC_{50} = 98,83 \mu\text{g/mL}$). Kết quả cho thấy, các mẫu cao chiết có hoạt tính ức chế α -amylase hiệu quả hơn so với Acarbose, đặc biệt là cao chiết từ lá ổi có hiệu quả gấp 2,3 lần so với đối chứng. Mặc dù, các cao chiết còn lẫn nhiều tạp chất, chưa được tinh sạch nhưng hiệu quả ức chế cao hơn Acarbose - một loại thuốc thương mại đã được tinh sạch. Điều này cho thấy, tiềm năng của các mẫu lá nguyên liệu trong điều trị ĐTĐ thông qua hoạt tính ức chế α -amylase. Enzyme α -amylase là một enzyme thực hiện bước đầu tiên trong quá trình thủy phân tinh bột, việc làm ức chế enzyme này sẽ dẫn tới một loạt các enzyme biến dưỡng carbohydrate hoạt động sau đó cũng đình trệ, hạn chế sự tạo thành glucose sau bữa ăn, giúp người bệnh ĐTĐ ổn định đường huyết.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -glucosidase

Enzyme α -glucosidase của ruột non ở người có vai trò thủy phân các liên kết α -1,4 của oligosaccharide thành glucose và sau đó được hấp thu qua niêm mạc ruột non và thẩm thấu vào máu. Bên cạnh đó, nồng độ glucose trong máu cao là biểu hiện của bệnh ĐTĐ, do đó, ức chế α -glucosidase sẽ điều khiển được lượng đường huyết trong máu,

góp phần điều trị hiệu quả ĐTĐ. Acarbose được biết đến như một chất ức chế α -glucosidase và đang được sử dụng phổ biến cho bệnh nhân ĐTĐ type 2. Acarbose cũng được sử dụng như một đối chứng dương trong các nghiên cứu về khả năng ức chế α -glucosidase của các cao chiết thực vật. Hoạt tính ức chế α -glucosidase tăng dần 14,11; 22,03; 28,23; 34,86; 44,58 và 53,63 (%) và khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% giữa các mức nồng độ, tương ứng với sự gia tăng nồng độ Acarbose 40 - 140 ($\mu\text{g/mL}$) (Hình 3).

Khi tăng nồng độ cao chiết ethanol của các mẫu lá, hiệu quả ức chế α -glucosidase tăng tuyến tính và có sự khác biệt giữa các mẫu nguyên liệu. Cao chiết ethanol từ các mẫu lá cho hiệu quả ức chế α -glucosidase cao nhất ở mức nồng độ là 100 $\mu\text{g/mL}$. Cụ thể, hiệu quả ức chế enzyme đạt 78,48% (lá bình bát), 71,41% (lá măng cầu ta), 70,45% (lá xoài), 64,23% (lá măng cầu Xiêm) và 52,72% (lá ổi). Trong khi đó, hiệu quả ức chế α -glucosidase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá thấp nhất ở mức nồng độ là 20 $\mu\text{g/mL}$: lá bình bát đạt 45,71%, lá xoài đạt 44,32%; lá măng cầu Xiêm đạt 38,12%; lá măng cầu ta đạt 23,87% và lá ổi đạt 9,66% (Hình 4).

Dựa vào kết quả phân tích khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của các loại cao chiết ethanol, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α -glucosidase của các loại cao chiết ethanol giữa các nồng độ khác nhau. Kết quả vẽ được các phương trình đường thẳng như sau:

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu Xiêm là $y = 0,286x + 36,989$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9804$ và giá trị IC_{50} là 45,49 $\mu\text{g/mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu ta là $y = 0,504x + 22,11$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9787$ và giá trị IC_{50} là $55,73 \mu\text{g/mL}$.

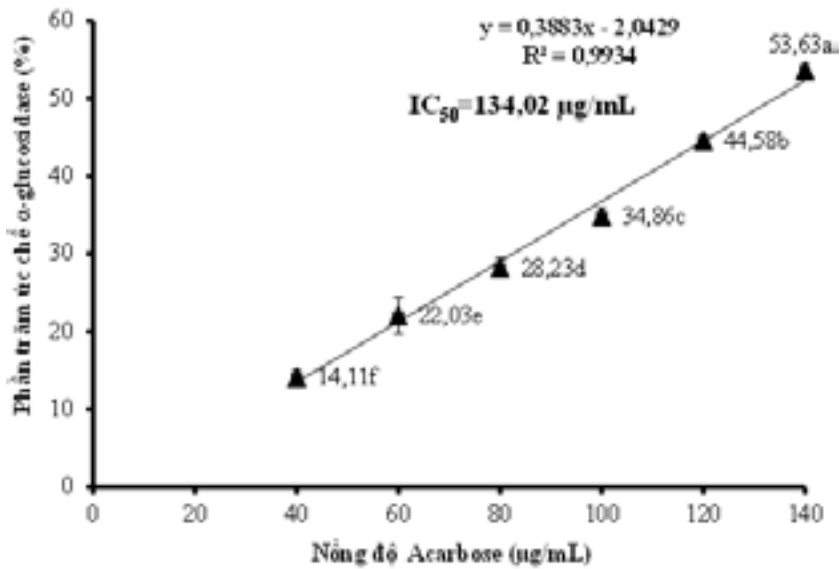
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá bình bát là $y = 0,3736x + 43,207$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9841$ và giá trị IC_{50} là $18,18 \mu\text{g/mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá xoài là $y = 0,2934x + 40,264$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9928$ và giá trị IC_{50} là $33,18 \mu\text{g/mL}$.

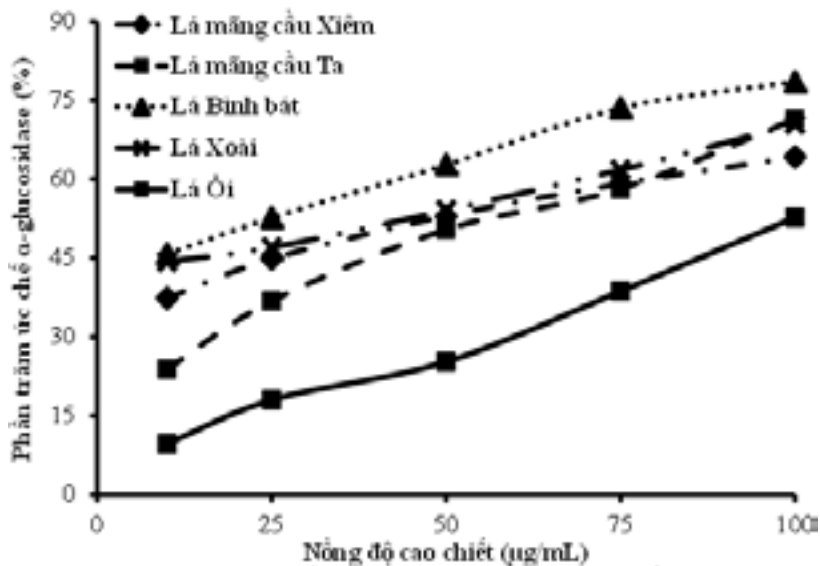
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá ôi là $y = 0,4649x + 4,4853$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9887$ và giá trị IC_{50} là $97,47 \mu\text{g/mL}$.

Hiệu quả ức chế α -glucosidase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá tốt hơn so với Acarbose, thể hiện qua giá trị IC_{50} của các mẫu cao chiết thấp

hơn so với Acarbose. Cụ thể, hiệu quả ức chế α -glucosidase giảm dần theo thứ tự: lá bình bát ($IC_{50} = 18,18 \mu\text{g/mL}$) > lá xoài ($IC_{50} = 33,18 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu Xiêm ($IC_{50} = 45,49 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu ta ($IC_{50} = 55,73 \mu\text{g/mL}$) > lá ôi ($IC_{50} = 97,47 \mu\text{g/mL}$) > Acarbose ($IC_{50} = 134,02 \mu\text{g/mL}$). Kết quả phân tích cho thấy, các mẫu cao chiết có hoạt tính ức chế α -glucosidase hiệu quả hơn so với Acarbose, đặc biệt là cao chiết từ lá bình bát có hiệu quả gấp 7,37 lần so với đối chứng. Mặc dù, các cao chiết ethanol còn lẫn nhiều tạp chất, chưa được tinh sạch nhưng hiệu quả ức chế của cao chiết cao hơn Acarbose – một loại thuốc thương mại đã được tinh sạch. Điều này cho thấy rằng, tiềm năng của các mẫu lá nguyên liệu trong điều trị đái tháo đường thông qua hoạt tính ức chế α -glucosidase.



Hình 3: Hiệu quả ức chế α -glucosidase của Acarbose



Hình 4: Hiệu quả ức chế α -glucosidase của các cao chiết ethanol

Khả năng ức chế α -glucosidase của Acarbose không mạnh là do cấu trúc hóa học của Acarbose. Acarbose có cấu trúc tương tự một tetrasaccharide, ức chế α -glucosidase theo kiểu chất kim hãm cạnh tranh. Tuy nhiên, trong 2 tiểu đơn vị xúc tác của α -glucosidase, Acarbose chỉ liên kết với một tiểu đơn vị xúc tác và liên kết rất yếu với tiểu đơn vị còn lại. Tác dụng ức chế α -glucosidase của Acarbose cũng tùy thuộc vào nguồn enzyme, Acarbose ức chế rất mạnh α -glucosidase ly trích từ ruột non của động vật có vú, trong khi ức chế rất thấp α -glucosidase ở nấm men (Sim *et al.*, 2008).

3.4. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol từ các mẫu lá

Gốc tự do là các nguyên tử có ít nhất một electron chưa ghép cặp trong vỏ ngoài cùng và có khả năng tồn tại độc lập. Gốc tự do được sản xuất trong quá trình trao đổi chất bình thường của cơ thể, stress sinh lý và là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh như ung thư, bệnh tim mạch, bệnh Alzheimer, Parkinson, xơ vữa động mạch,... Vitamin C là chất có hoạt tính mạnh đối với gốc tự do được sử dụng làm chất chuẩn trong nhiều tài liệu tham khảo. Hiệu quả ức chế gốc tự do DPPH tăng khi gia tăng nồng độ vitamin C và khác biệt có ý nghĩa ở mức độ 5%. Hiệu quả khử gốc tự do của vitamin C đạt cao nhất ở nồng độ 70 $\mu\text{g/ml}$, đạt 88,98%. Kế đến là nồng độ 60 $\mu\text{g/ml}$ với hiệu suất 81,05% và nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$, với hiệu suất 6,02% (Hình 5).

Cao chiết từ các mẫu lá ở các nồng độ khác nhau, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau. Cao chiết có hiệu quả khử gốc tự do DPPH cao nhất ở nồng độ cao chiết 300 $\mu\text{g/mL}$: lá măng cầu Xiêm (63,24%), kế đến là lá ổi (57,91%), lá xoài (57,70%), lá bình bát (54,15%) và thấp nhất là lá măng cầu ta (52,37%). Trong khi đó, ở nồng độ cao chiết 50 $\mu\text{g/mL}$, hiệu quả gốc tự do DPPH đạt thấp nhất: lá xoài (15,81%), lá măng cầu Xiêm (15,81%), lá măng cầu ta (13,04%), lá ổi (11,66%) và lá bình bát (8,89%) (Hình 6).

Dựa vào kết quả phân tích khả năng khử gốc tự

do DPPH của các loại cao chiết ethanol, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng khử gốc tự do DPPH của các loại cao chiết ethanol giữa các nồng độ khác nhau. Kết quả vẽ được các phương trình đường thẳng như sau:

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu Xiêm là $y = 0,205x + 4,2602$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9854$ và giá trị IC_{50} là 223,12 $\mu\text{g/mL}$.

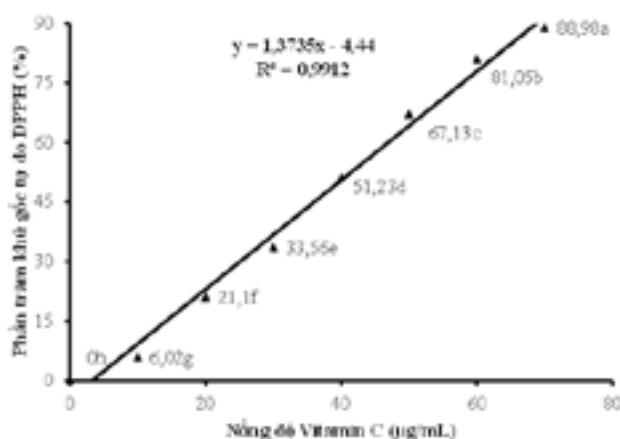
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá măng cầu ta là $y = 0,1792x + 3,7304$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9805$ và giá trị IC_{50} là 267,61 $\mu\text{g/mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá bình bát là $y = 0,1739x + 0,4195$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9852$ và giá trị IC_{50} là 285,11 $\mu\text{g/mL}$.

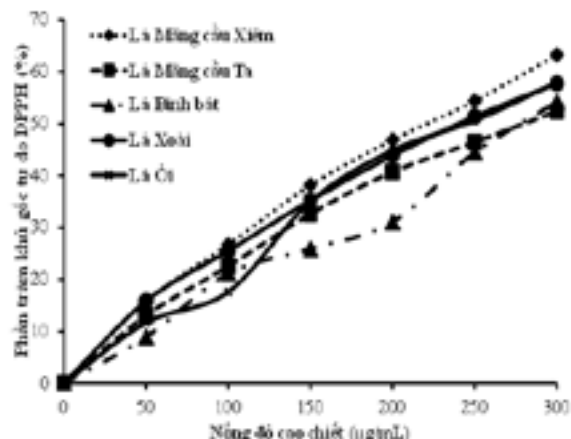
Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá xoài là $y = 0,1876x + 4,6405$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9808$ và giá trị IC_{50} là 241,79 $\mu\text{g/mL}$.

Phương trình đường thẳng của cao chiết ethanol lá ổi là $y = 0,1992x + 1,2032$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9811$ và giá trị IC_{50} là 244,96 $\mu\text{g/mL}$.

Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol của các mẫu lá cao hơn so với đối chứng dương vitamin C và giảm dần theo thứ tự lá bình bát ($IC_{50} = 285,11 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu ta ($IC_{50} = 267,61 \mu\text{g/mL}$) > lá ổi ($IC_{50} = 244,96 \mu\text{g/mL}$) > lá xoài ($IC_{50} = 241,79 \mu\text{g/mL}$) > lá măng cầu Xiêm ($IC_{50} = 223,12 \mu\text{g/mL}$) > Viatmin C ($IC_{50} = 39,63 \mu\text{g/mL}$). Giá trị IC_{50} của cao chiết gấp lần lượt 7,19; 6,75; 6,18; 6,10 và 5,63 lần so với Vitamin C. Điều này cho thấy rằng, hiệu quả khử gốc tự do của cao chiết ethanol từ các mẫu lá thấp hơn so với vitamin C. Nguyên nhân của sự khác biệt là do cao chiết từ các mẫu lá được trích bằng phương pháp ngâm dầm rồi đem lọc và cô quay, trong quá trình lọc có thể chưa loại bỏ được hết các tạp chất nên sản phẩm chưa được tinh sạch. So với vitamin C là một chất chống oxy hóa cao và là sản phẩm thương mại nên sẽ có độ tinh sạch cao hơn nên cho hiệu quả ức chế gốc tự do cao hơn cao chiết từ các mẫu lá.



Hình 5: Hiệu quả khử gốc tự do DPPH của Vitamin C



Hình 6: Hiệu quả khử gốc tự do DPPH của các cao chiết ethanol

4. Kết luận

Phân tích định tính các hợp chất thiên nhiên có trong các cao chiết ethanol từ các mẫu lá bao gồm các hợp chất như tannin, flavonoid, saponin và alkaloid.

Cao chiết ethanol từ các mẫu lá (lá ổi, xoài, măng cầu ta, măng cầu Xiêm và bình bát) đều có khả năng ức chế hoạt tính của enzyme α -amylase với giá trị IC_{50} tương ứng là 42,92; 66,17; 64,85; 76,35 và 88,93 $\mu\text{g/mL}$

Cao chiết ethanol từ các mẫu lá (bình bát, xoài, măng cầu Xiêm, măng cầu ta, và lá ổi) đều có khả năng ức chế hoạt tính của enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} tương ứng là 18,18; 33,18; 45,49; 55,73 và 97,47 $\mu\text{g/mL}$

Cao chiết ethanol từ các mẫu lá (bình bát, măng cầu ta, ổi, xoài và măng cầu Xiêm) có khả năng khử gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} lần lượt là 285,11; 267,61; 244,96; 241,79 và 223,12 $\mu\text{g/mL}$.

Tài liệu tham khảo

- Đái, Thị Xuân Trang, Phạm, Thị Lan Anh, Trần, Thanh Mến và Bùi, Tấn Anh. 2012. “Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá ổi (*Psidium guajava* L.)”. *Tạp chí khoa học*, 2012: 22b, trang 163-171.
- Gopinath, S.M., P. Priyanka, K.S. Dayananda, J.M. Reddy, G.M. Ashwini and D.V. Nair. 2013. “In vitro Inhibitory Effect of Polyherbal Formulation on alpha-amylase”. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, Vol. 2, No. 9, pp 4556-4566.
- Habeeb, M.N., R.N. Prakash and S.M. Fahmi. 2012. “Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by *Morus alba* Linn leaf extracts”. *Journal of Pharmacy Research*, Vol. 5, No. 1, pp 285-289.
- Hoàng Sâm, Hứa, Văn Thao, Phạm, Văn Khang và Nguyễn, Anh Tuấn. 2009. *Góp phần nghiên cứu thành phần hóa học của cây Lược vàng*. Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.
- Miura T., S. Takagi and T. Ishida, 2012. “Management of diabetes and its complications with Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol 5, pp 321-329.
- Phan, Quốc Kinh. 2011. *Giáo trình các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học*. Hà Nội: Giáo dục Việt Nam.
- Serrano, J., R. Puupponen-Pimia, A. Dauer, A. Aura and F. Saura-Calixto. 2009. “Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects”. *Mol. Nutr. Food Res.*, Vol 53, pp 310-329.
- Shirwaikar, A., K. Rajendran and I.S. Punithaa, 2006. “In vivo antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine”. *Biol Pharm Bull*, Vol 29, pp 1906-1910.
- Sim, L., R. Quezada-Calvillo, E.E. Sterchi, B.L. Nichols and D.R. Rose. 2008. “Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity”. *J. Mol. Biol.*, Vol. 375, No. 3, pp 782-792.
- Yadav, M., S. Chatterji, S.K. Gupta and G. Watal. 2014. “Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine”. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 6, No.5, pp 539-542.