

ALPHA-GLUCOSIDASE AND ALPHA-AMYLASE ENZYM INHIBITION ISOLATED FROM KALANCHOE PINNATA (LAM.) – PERS.) LEAVES

Le Thu Thuy*, Vo Ngoc To Trinh, Vo Phat Thinh

Nguyen Tat Thanh University

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 09/5/2023	Diabetes is a disease caused by carbohydrate metabolism disorder when the insulin of the pancreas is lacking or reduced. Decreasing α -amylase and α -glucosidase enzymes activities will inhibit carbohydrate hydrolyzing enzymes and retarding the absorption of glucose. <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. is noted for amounts of compounds such as alkaloids, tannins, flavonoids, and polyphenols that inhibit α -amylase and α -glucosidase activities. Alcohol 96% crude extract was obtained from leaf powder and sequentially extracted with solvents of increasing polarity (n-hexane, diclorometan, ethyl acetate, n-butan and residual aqueous fraction). Fraction extracts were analyzed α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity. Results showed that the ethyl acetate fraction elicited a significantly highest inhibitory effects on α -amylase (IC_{50} 1.37 ± 0.29 mg/mL) and α -glucosidase (IC_{50} 0.39 ± 0.06 mg/mL), gradually decreased for the n-butan, dichloromethane, aqueous and n-hexane extract.
Ngày hoàn thiện: 23/6/2023	
Ngày đăng: 23/6/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers	
Diabetes	
α -amylase	
α -glucosidase	
Inhibitor of enzyme activities	

HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM ALPHA-GLUCOSIDASE VÀ ALPHA-AMYLASE CỦA LÁ CÂY SỐNG ĐỜI (KALANCHOE PINNATA (LAM.) – PERS.)

Lê Thu Thủy*, Võ Ngọc Tố Trinh, Võ Phát Thịnh

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 09/5/2023	Đối với bệnh nhân đái tháo đường, kiểm soát nồng độ glucose là mục tiêu quan trọng trong việc giảm các biến chứng liên quan đến sức khỏe và duy trì đường huyết ổn định. Enzym α -amylase và α -glucosidase bị ức chế sẽ làm quá trình tiêu hóa carbohydrat bị ức chế, giảm quá trình hấp thu glucose và giảm đường huyết. Cây Sống đời (<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.) được ghi nhận có lượng tannin, flavonoid và polyphenol cao, có hoạt tính ức chế hai enzym trên. Cao tổng cồn 96% được thu nhận từ bột khô của lá Sống đời, lắc phân đoạn lần lượt qua các dung môi n-hexan, diclorometan, ethyl acetat, n-butan, phần dịch còn lại là nước, cô quay thu hồi dung môi thu cao phân đoạn và khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -amylase và α -glucosidase. Hoạt tính ức chế enzym α -amylase và α -glucosidase cao nhất ở cao ethyl acetate (IC_{50} lần lượt là 1,37 và 0,39 mg/mL) và giảm dần đối với các cao n-butan, diclorometan, nước và n-hexan.
Revised: 23/6/2023	
Published: 23/6/2023	
KEYWORDS	
<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	
Đái tháo đường	
α -amylase	
α -glucosidase	
Hoạt tính ức chế enzym	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7898>

* Corresponding author. Email: letthuy@ntt.edu.vn

1. Giới thiệu

Khi tuyến tụy của cơ thể không hoặc giảm sản xuất insulin, carbohydrat trong cơ thể không được chuyển hóa dẫn đến tăng đường huyết và đái tháo đường (ĐTĐ). Đối với các bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2, đường huyết cao trong một thời gian dài sẽ gây nên các rối loạn chuyển hóa carbohydrat, protein, lipid và gây tổn thương ở các cơ quan như tim, mạch máu, thận, mắt, thần kinh [1]. Trong điều trị ĐTĐ, kiểm soát lượng đường trong máu thông qua kiểm soát lượng carbohydrat là một mục tiêu quan trọng giúp giảm các biến chứng đối với bệnh nhân. Alpha amylase là một loại enzym quan trọng, thủy phân carbohydrat như tinh bột thành các monosacarit. Những chất này tiếp tục được α -glucosidase thủy phân thành glucose, khi được hấp thụ, sẽ đi vào máu. Do đó, hạn chế hoạt động của hai enzym này sẽ hạn chế quá trình tiêu hóa carbohydrat, làm chậm quá trình hấp thu glucose và giảm đường huyết [2]. Các nhóm thuốc thường được sử dụng trong điều trị bệnh hiện nay như sulfonylurea, nhóm ức chế enzym α -glucosidase, nhóm thiazolidinedione, nhóm thuốc ức chế DiPeptidyl Peptidase 4,... Tuy nhiên, các thuốc này thường có giá thành cao và nhiều tác dụng phụ như tăng trọng lượng cơ thể, vàng da, suy giảm lượng đường trong máu, tiêu chảy,... [2] gây các trở ngại khi điều trị và chăm sóc bệnh nhân.

Ngoài việc sử dụng các loại thuốc điều trị ĐTĐ, hiện nay việc sử dụng thảo dược trong hỗ trợ điều trị bệnh khá phổ biến do ít tác dụng phụ và chi phí thấp. Các chất như alkaloid, tannin, flavonoid, polyphenol có khả năng ức chế hoạt tính của hai enzym trên được phát hiện ở nhiều nhóm sinh vật như thực vật, động vật, nấm, vi khuẩn nhưng phong phú nhất vẫn là thực vật [3]-[5]. Một trong số đó là cây Sồng đời hay còn được gọi với tên khác như cây Thuốc bỏng (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.). Trên thế giới cũng đã có nghiên cứu về khả năng ức chế hoạt tính enzym α -glucosidase *in vitro* từ dịch chiết lá [6]. Theo Ojo và cộng sự, cao phân đoạn ethyl acetat có hàm lượng các hợp chất phenolic, flavonoid, tannin và vitamin C cao nhất. Đây cũng là phân đoạn có hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase cao hơn so với các phân đoạn n-butan, n-hexan [7]. Dịch chiết cồn 70° của lá có khả năng làm hạ đường huyết trên chuột ở hàm lượng 500 mg/kg qua đường uống [8]. Trong y học cổ truyền Trung Quốc và một số nước châu Á, lá có tác dụng tiêu sưng, khử độc, chữa vết thương do bỏng, viêm tai giữa cấp tính [9]. Ở Việt Nam, cây Sồng đời là một loài dễ trồng, dễ nhân giống. Nhận thấy đây là một nguồn dược liệu có tiềm năng trong hỗ trợ điều trị đái tháo đường, vì vậy khảo sát hoạt tính ức chế alpha-amylase và alpha-glucosidase của lá cây Sồng đời (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) – Pers.) được thực hiện.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lá bánh tẻ cây Sồng đời (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) được thu ở thành phố Quy Nhơn, tỉnh Bình Định từ tháng 02/2022 – tháng 06/2022.

Lá tươi được vận chuyển về và định danh tại phòng thí nghiệm Thực hành Thực vật dược, khoa Dược, trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu cao phân đoạn

Lá cây Sồng đời (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) được cắt nhỏ, phơi khô và xay thành bột. Bột lá được ngâm đậm trong cồn 96° (tỉ lệ 1:8 (w/v)) ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, lọc, thu dịch chiết, cô quay ở 50°C thu được cao thô.

Cao thô được hòa tan trong cồn 96° và nước để làm pha căn bản và phân đoạn bằng bình chiết với các dung môi có độ phân cực tăng dần lần lượt là n-hexane, diclorometan, ethyl acetate, n-butan, dịch còn lại là cao nước. Dịch chiết được để yên trong bình lắng để phân tách dung môi và thu hồi dung môi bằng máy cô quay ở 50°C để thu các cao phân đoạn.

Độ ẩm của bột dược liệu và độ ẩm cao chiết được xác định bằng cân phân tích ẩm Ohaus MB120. Hiệu suất chiết cao được tính theo công thức (1) [10]:

$$H(\%) = \frac{\text{Khối lượng cao thu được} \times (100 - \text{độ ẩm của cao chiết})}{\text{Khối lượng nguyên liệu ban đầu} \times (100 - \text{độ ẩm của nguyên liệu})} \quad (1)$$

2.2.2. Khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -amylase của các cao phân đoạn

Hoạt tính ức chế enzym của các cao phân đoạn được xác định bằng phương pháp đo lượng tinh bột còn lại dựa trên phản ứng màu xanh của phức hợp tinh bột-iodine theo Lê Quốc Duy và cộng sự [11], có điều chỉnh. Cao chiết được pha trong DMSO 5% thành nồng độ 5,0 mg/mL và pha loãng thành dãy nồng độ 0,2; 0,4; 0,6 mg/mL đến 2,0 mg/mL bằng dung dịch đệm phosphate pH 7.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: 10 μ L enzym α -amylase 0,5 U/mL, 20 μ L cao chiết ở các nồng độ, 20 μ L dung dịch đệm phosphate pH 7, ủ hỗn hợp ở 37°C trong thời gian 10 phút. Bổ sung 50 μ L tinh bột 1 mg/mL vào hỗn hợp, ủ ở 37°C trong 10 phút. Dừng phản ứng bằng 20 μ L HCl 1N, sau đó thêm 60 μ L thuốc thử Iodine 0,1N. Hỗn hợp được đo quang phổ ở bước sóng $\lambda = 660$ nm để xác định lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Song song, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzym α -amylase với đối chứng dương là Acarbose ở các nồng độ tương ứng. Đối với mẫu đối chứng, 10 μ L enzym α -amylase 0,5 U/mL và 20 μ L cao chiết được thay thế bằng 30 μ L dung dịch đệm phosphate pH 7.

Phần trăm enzym α -amylase bị ức chế (%) được tính dựa vào công thức (2):

$$\% \text{ ức chế } \alpha - \text{amylase} = 100 - \frac{(\text{Độ hấp thu của mẫu đối chứng} - \text{Độ hấp thu của mẫu cao chiết})}{\text{Độ hấp thu của mẫu đối chứng}} \times 100 \quad (2)$$

Dựa vào phần trăm enzym bị ức chế và nồng độ mẫu, dựng đường chuẩn có phương trình $y = ax + b$ và xác định chỉ số IC_{50} . IC_{50} được định nghĩa là nồng độ (mg/mL) của mẫu mà tại đó có thể ức chế 50% hoạt tính của enzym, mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC_{50} càng thấp [11].

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế α -glucosidase của các cao phân đoạn

Hoạt tính ức chế enzym của các cao phân đoạn được xác định bằng phương pháp đo lượng p-nitrophenol được tạo ra theo Lê Quốc Duy và cộng sự [11], có điều chỉnh. Cao chiết được pha trong DMSO 5% thành nồng độ 5,0 mg/mL và pha loãng thành dãy nồng độ 0,2; 0,4; 0,6 mg/mL đến 2,0 mg/mL bằng dung dịch đệm phosphate pH 7.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: 20 μ L cao chiết, 50 μ L đệm phosphate pH 7 và 50 μ L p-Nitrophenyl α -D-Glucoside (pNPG) 0,5 mg/mL ủ ở 37°C, thời gian 15 phút. Tiếp theo, thêm 10 μ L enzym α -glucosidase 0,2 u/mL vào hỗn hợp, ủ ở 37°C, thời gian 15 phút. Sau cùng, bổ sung 100 μ L Na_2CO_3 0,2M để dừng phản ứng. Hoạt động ức chế của enzym α -glucosidase được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng $\lambda = 405$ nm. Song song, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzym α -glucosidase với đối chứng dương là Acarbose ở các mức nồng độ tương ứng. Đối với mẫu đối chứng 20 μ L cao chiết được thay thế bằng 20 μ L dung dịch đệm phosphate pH 7. Phần trăm enzym 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 thu quang phổ theo công thức (3):

$$\% \text{ ức chế } \alpha - \text{glucosidase} = \frac{(\text{Độ hấp thu của mẫu đối chứng} - \text{Độ hấp thu của mẫu cao chiết})}{\text{Độ hấp thu của mẫu đối chứng}} \times 100 \quad (3)$$

Dựa vào phần trăm enzym bị ức chế và nồng độ mẫu, dựng đường chuẩn có phương trình $y = ax + b$ và xác định chỉ số IC_{50} . IC_{50} được định nghĩa là nồng độ (mg/mL) của mẫu mà tại đó có thể ức chế 50% hoạt tính của enzym, mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC_{50} càng thấp [11].

2.2.4. Xử lý số liệu và so sánh thống kê

Các số liệu được xử lý và so sánh thống kê bằng phần mềm SPSS (Statistical Package for the Social Science) phiên bản 20.0 cho Windows. Các số trung bình trong cột của bảng với các mẫu tự khác nhau đính kèm khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thu cao phân đoạn

Bột dược liệu sau khi được thu nhận có độ ẩm là 6,27%. Hiệu suất thu hồi cao còn đạt 27,38% so với trọng lượng khô. Phần trăm của các cao phân đoạn trong cao tổng cao nhất với cao n-hexan 43,52%, cao nước 24,16% và giảm dần ở các phân đoạn ethyl acetat, diclorometan và n-butan (bảng 1). Kết quả này cho thấy trong cao n-hexan có lượng lớn các hợp chất ít phân cực, cao nước có nhiều hợp chất phân cực hơn so với các cao phân đoạn còn lại.

Đối với những nghiên cứu ly trích hợp chất từ thực vật, dung môi được sử dụng thường là nước hoặc cồn – nước. Tuy nhiên, việc sử dụng nước là dung môi chiết ban đầu sẽ gặp một số vấn đề như khó khăn trong loại bỏ nước ra khỏi dịch chiết vì nước có nhiệt độ sôi cao, áp suất hơi thấp. Dịch chiết nước dễ bị nhiễm các vi sinh vật nếu bảo quản không tốt nên cần phải thu hồi dung môi hoặc lắc phân bố với các dung môi sớm. Đa số trong các thí nghiệm, dung môi được sử dụng để thu cao tổng ban đầu thường là alcohol 80% như methanol và ethanol. Những dung môi này có khả năng thấm tốt qua màng sinh chất của dược liệu và có thể tạo liên kết hidro liên phân tử với các nhóm phân cực khác, do đó có thể chiết được các hợp chất có độ phân cực mạnh, vừa và yếu [12]. Vì tính an toàn cho sức khỏe và môi trường nên methanol thường ít được sử dụng. Dung môi cồn – nước thường được sử dụng nhiều trong việc ly trích các hợp chất tự nhiên từ thực vật, song lượng nước có trong dung môi sẽ khó thu hồi hơn việc sử dụng cồn cao độ. Vì vậy, dung môi được lựa chọn cho việc thu cao tổng lá cây Sóng đời là cồn 96°.

Độ ẩm của cao tổng và các cao phân đoạn n-hexan, diclorometan, ethyl acetat, n-butan và nước lần lượt là 14,46%, 15,54%, 12,99%, 11,67%, 9,49%, 12,60%. Các kết quả này phù hợp với quy định về lượng nước còn lại trong cao chiết không quá 20% theo Dược điển Việt Nam V [13].

Bảng 1. Độ ẩm và hiệu suất thu nhận cao chiết từ lá cây Sóng đời (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.)

Cao chiết	Độ ẩm (%)	Hiệu suất (%)
Cao tổng cồn 96°	14,46 ± 0,40	27,38 ± 0,95
Cao n-hexan	15,54 ± 1,25	43,52 ± 0,44
Cao diclorometan	12,99 ± 0,39	5,37 ± 0,47
Cao ethyl acetat	11,67 ± 0,77	21,04 ± 0,11
Cao n-butan	9,49 ± 0,45	0,69 ± 0,60
Cao nước	12,60 ± 0,16	24,16 ± 0,14

3.2. Hoạt tính ức chế enzym α -amylase của các cao phân đoạn

Các cao phân đoạn n-hexan, diclorometan, ethyl acetat, n-butanol và nước đều có hoạt tính ức chế enzym α -amylase ở các nồng độ từ 0,2; 0,4 đến 1,8; 2,0 mg/mL. Ở tất cả các cao phân đoạn, hoạt tính ức chế enzym α -amylase tăng khi nồng độ cao chiết tăng. Ở cùng một nồng độ, hoạt tính ức chế enzym của cao ethyl acetat và n-butan cao hơn so với các cao diclorometan, n-hexan và cao nước (bảng 2).

Acarbose được sử dụng như nghiệm thức đối chứng trong các thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế enzym α -amylase. Hoạt tính ức chế enzym α -amylase không tăng khi tăng nồng độ Acarbose từ 0,2 mg/mL đến 0,6 mg/mL. Ở nồng độ 0,8 mg/mL đến 1,6 mg/mL, sự ức chế enzym của Acarbose tăng mạnh từ 64,81% đến 82,92% nhưng ở nồng độ 1,8 mg/mL, sự ức chế hoạt động của enzym tăng không đáng kể (bảng 2).

Dựa vào phần trăm ức chế enzym α -amylase của các cao phân đoạn và Acarbose, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế enzym (bảng 4).

IC₅₀ của Acarbose là 0,62 mg/mL. Trong các cao phân đoạn, phân đoạn ethyl acetat và n-butan có giá trị IC₅₀ cao hơn, lần lượt là 1,38 và 2,27 mg/mL. Các phân đoạn n-hexan, nước và diclorometan có IC₅₀ cao hơn hẳn phân đoạn ethyl acetat và n-butan với IC₅₀ lần lượt là 9,72; 10,96 và 11,73 mg/mL (hình 1).

Hiệu quả ức chế của cao chiết hoặc một chất càng thấp, có nghĩa là hợp chất hoặc cao chiết đó có khả năng ức chế enzym càng cao. Trong thí nghiệm này, Acarbose sẽ có hoạt tính ức chế enzym cao nhất với $IC_{50} = 0,62$ mg/mL. Acarbose là một tetrasaccharid có tác dụng làm hạ glucose máu. Cơ chế hoạt động của Acarbose là ức chế có tính chất cạnh tranh với enzym α -amylase, làm chậm tiêu hóa và hấp thu carbohydrat, kết quả là glucose máu tăng chậm hơn sau khi ăn. Đây là loại thuốc thường được sử dụng trong điều trị đái tháo đường, do đó hoạt tính ức chế α -amylase rất cao [14]. Trong các cao phân đoạn, cao ethyl acetat và n-butan có IC_{50} lần lượt là 1,38 và 2,27 mg/mL, thấp hơn so với đối chứng Acarbose nhưng có hoạt tính tốt nhất so với các cao phân đoạn còn lại. Cao diclorometan, nước và n-hexan có hoạt tính thấp hơn với IC_{50} lần lượt là 9,72; 10,96 và 11,73 mg/mL.

Bảng 2. Phần trăm ức chế enzym α -amylase của cao phân đoạn từ lá cây Sống đời
(*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.)

Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Phần trăm α -amylase bị ức chế bởi Acarbose và cao chiết (%)					
	Acarbose	Cao n-hexan	Cao diclorometan	Cao ethyl acetat	Cao n-butan	Cao nước
0,2	54,74 $\pm$ 0,26 ^f	31,85 $\pm$ 0,48 ^f	26,89 $\pm$ 0,19 ^h	50,07 $\pm$ 1,11 ⁱ	48,42 $\pm$ 0,42 ⁱ	26,67 $\pm$ 0,95 ^g
0,4	55,14 $\pm$ 0,29 ^f	33,17 $\pm$ 0,48 ^{ef}	29,00 $\pm$ 0,37 ^g	51,74 $\pm$ 0,71 ^h	50,20 $\pm$ 0,57 ^h	27,38 $\pm$ 0,68 ^g
0,6	57,39 $\pm$ 1,14 ^f	34,83 $\pm$ 1,05 ^e	31,54 $\pm$ 0,50 ^f	53,47 $\pm$ 0,86 ^g	51,56 $\pm$ 0,29 ^g	30,46 $\pm$ 0,77 ^f
0,8	64,81 $\pm$ 2,42 ^e	39,66 $\pm$ 2,19 ^d	33,57 $\pm$ 1,11 ^e	53,76 $\pm$ 0,31 ^g	52,22 $\pm$ 0,05 ^g	32,35 $\pm$ 0,27 ^e
1,0	68,62 $\pm$ 2,92 ^d	40,60 $\pm$ 0,86 ^d	35,58 $\pm$ 1,15 ^d	56,30 $\pm$ 0,57 ^f	53,67 $\pm$ 0,53 ^f	35,60 $\pm$ 0,33 ^d
1,2	71,62 $\pm$ 2,22 ^d	41,51 $\pm$ 0,95 ^d	38,29 $\pm$ 1,03 ^c	58,09 $\pm$ 1,41 ^e	55,87 $\pm$ 0,64 ^e	37,93 $\pm$ 0,37 ^c
1,4	76,73 $\pm$ 3,04 ^c	44,67 $\pm$ 1,82 ^c	42,15 $\pm$ 0,77 ^b	60,26 $\pm$ 1,23 ^d	57,62 $\pm$ 0,44 ^d	41,97 $\pm$ 2,23 ^b
1,6	82,92 $\pm$ 1,95 ^b	47,11 $\pm$ 0,78 ^b	41,40 $\pm$ 0,60 ^b	63,61 $\pm$ 0,57 ^c	58,53 $\pm$ 0,44 ^c	43,02 $\pm$ 1,92 ^b
1,8	84,44 $\pm$ 2,91 ^b	48,22 $\pm$ 1,09 ^{ab}	42,69 $\pm$ 0,55 ^b	65,14 $\pm$ 0,48 ^b	61,07 $\pm$ 0,46 ^b	45,44 $\pm$ 0,74 ^a
2,0	91,66 $\pm$ 0,95 ^a	49,95 $\pm$ 1,79 ^a	46,56 $\pm$ 0,63 ^a	67,00 $\pm$ 0,80 ^a	64,58 $\pm$ 0,98 ^a	46,70 $\pm$ 0,23 ^a

Ghi chú: Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

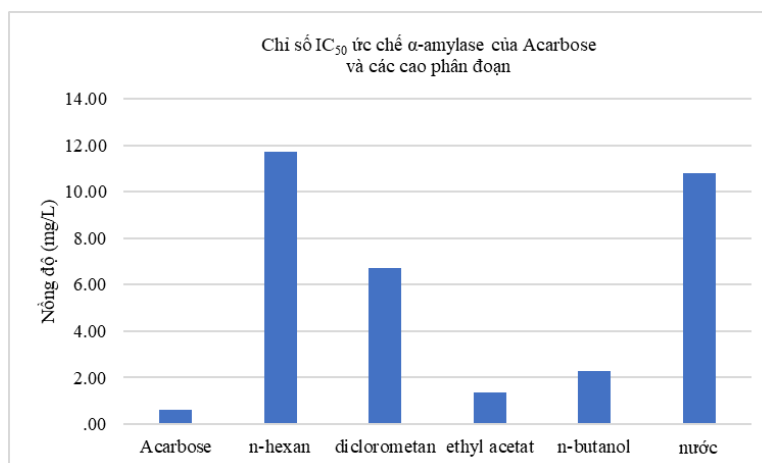
Bảng 3. Phần trăm ức chế enzym α -glucosidase của cao phân đoạn từ lá cây Sống đời
(*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.)

Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Phần trăm α -glucosidase bị ức chế bởi Acarbose và cao chiết (%)					
	Acarbose	Cao n-hexan	Cao diclorometan	Cao ethyl acetat	Cao n-butan	Cao nước
0,2	57,38 $\pm$ 0,47 ⁱ	17,33 $\pm$ 1,14 ⁱ	22,04 $\pm$ 1,51 ⁱ	55,30 $\pm$ 0,56 ⁱ	52,33 $\pm$ 0,56 ⁱ	18,53 $\pm$ 0,26 ^k
0,4	58,66 $\pm$ 0,62 ⁱ	24,77 $\pm$ 1,00 ^h	26,47 $\pm$ 1,74 ^h	56,76 $\pm$ 1,09 ⁱ	53,77 $\pm$ 0,95 ^{hi}	20,82 $\pm$ 0,28 ⁱ
0,6	61,52 $\pm$ 0,89 ^h	30,19 $\pm$ 1,20 ^g	40,39 $\pm$ 2,43 ^g	58,78 $\pm$ 0,82 ^h	54,87 $\pm$ 1,31 ^h	23,27 $\pm$ 0,36 ^h
0,8	64,63 $\pm$ 1,19 ^g	36,37 $\pm$ 0,92 ^f	55,41 $\pm$ 0,61 ^f	65,69 $\pm$ 1,19 ^g	61,95 $\pm$ 0,49 ^g	26,28 $\pm$ 0,48 ^g
1,0	70,23 $\pm$ 0,99 ^f	42,84 $\pm$ 1,75 ^e	64,73 $\pm$ 1,44 ^e	72,09 $\pm$ 0,83 ^f	65,21 $\pm$ 1,04 ^f	29,57 $\pm$ 0,36 ^f
1,2	78,32 $\pm$ 0,39 ^e	49,22 $\pm$ 1,88 ^d	73,98 $\pm$ 2,38 ^d	74,91 $\pm$ 1,03 ^e	73,35 $\pm$ 1,33 ^e	34,53 $\pm$ 0,18 ^e
1,4	83,91 $\pm$ 0,22 ^d	53,36 $\pm$ 1,45 ^c	77,22 $\pm$ 1,30 ^c	78,58 $\pm$ 0,73 ^d	75,49 $\pm$ 1,59 ^d	39,92 $\pm$ 0,67 ^d
1,6	86,04 $\pm$ 0,70 ^c	54,34 $\pm$ 1,30 ^{bc}	93,71 $\pm$ 0,95 ^b	84,35 $\pm$ 1,27 ^c	81,11 $\pm$ 0,59 ^c	46,50 $\pm$ 0,13 ^c
1,8	91,56 $\pm$ 0,97 ^b	56,67 $\pm$ 1,73 ^{ab}	95,46 $\pm$ 0,92 ^{ab}	89,88 $\pm$ 0,47 ^b	86,57 $\pm$ 1,25 ^b	55,31 $\pm$ 1,00 ^b
2,0	95,41 $\pm$ 0,51 ^a	58,77 $\pm$ 1,56 ^a	96,61 $\pm$ 1,10 ^a	93,15 $\pm$ 1,03 ^a	91,31 $\pm$ 1,89 ^a	61,69 $\pm$ 0,93 ^a

Ghi chú: Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$.

Bảng 4. Phương trình hồi quy và chỉ số IC_{50} ức chế hoạt tính α -amylase của cao phân đoạn

Cao chiết	Phương trình	Hệ số tương quan R^2	IC_{50}
Cao n-hexan	$y = 10,473x + 29,64$	0,98	9,72
Cao diclorometan	$y = 10,625x + 25,08$	0,98	11,73
Cao ethyl acetat	$y = 9,6412x + 47,34$	0,98	1,38
Cao n-butan	$y = 8,3267x + 46,22$	0,97	2,27
Cao nước	$y = 12,142x + 23,40$	0,99	10,96
Acarbose	$y = 21,327x + 47,35$	0,98	0,62



Hình 1. Chỉ số IC_{50} ức chế α -amylase của Acarbose và cao phân đoạn

Theo Tundis và cộng sự, polyphenol có hiệu quả ức chế hoạt tính α -amylase cao hơn so với các hợp chất khác. Trong đó, tannin có hoạt tính cao hơn so với anthocyanin. Khi loại bỏ tannin ra khỏi cao chiết của quả Dâu tây, hiệu quả ức chế α -mylase không còn, hoặc khi làm giàu tannin có trong cao chiết quả Mâm xôi, hoạt tính ức chế enzym amylase được ghi nhận cao hơn so với bình thường [5]. Điều này được thể hiện trong nghiên cứu của Ojo và cộng sự, cao phân đoạn ethyl acetat và n-butan từ lá cây Sồng đời thu ở Nigeria có lượng tannin tổng và hoạt tính ức chế enzym cao hơn các phân đoạn khác [7]. Tuy nhiên, hiệu quả ức chế enzym α -amylase trong thí nghiệm này thấp hơn so với nghiên cứu của Ojo. Kết quả này có thể do điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng của Việt Nam khác so với Nigeria và thời điểm thu nhận được liệu có thể không giống nhau dẫn đến hoạt tính khác nhau.

3.3. Hoạt tính ức chế α -glucosidase của các cao phân đoạn

Các cao n-hexan, diclorometan, ethyl acetat, n-buanol và nước đều có khả năng ức chế hoạt động của α -glucosidase ở các nồng độ từ 0,2; 0,4 đến 1,8; 2,0 mg/mL. Ở tất cả các cao phân đoạn, hoạt tính ức chế α -glucosidase tăng khi nồng độ cao chiết tăng. Ở cùng một nồng độ, khả năng ức chế enzym của cao ethyl acetat và n-butan cao hơn so với các cao còn lại (bảng 3).

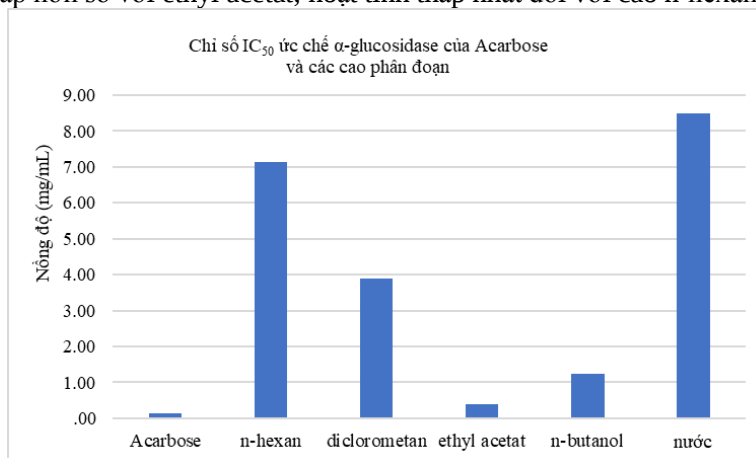
Acarbose là đối chứng trong thí nghiệm này. Ở nồng độ 0,6 mg/mL, hoạt tính ức chế α -glucosidase bắt đầu tăng từ 58,66%, khả năng ức chế tăng dần khi nồng độ Acarbose tăng dần. Ở nồng độ 2,0 mg/mL hoạt tính ức chế đạt 95,41%. Dựa vào phần trăm ức chế enzym α -glucosidase của các cao và Acarbose, nghiên cứu tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế enzym (bảng 5).

Bảng 5. Phương trình hồi quy và chỉ số IC_{50} ức chế hoạt tính α -glucosidase của cao phân đoạn

Cao chiết	Phương trình	Hệ số tương quan R^2	IC_{50}
Cao n-hexan	$y = 2,466x + 16,58$	0,95	7,12
Cao diclorometan	$y = 45,313x + 14,76$	0,97	3,89
Cao ethyl acetat	$y = 22,48x + 48,22$	0,99	0,40
Cao n-butan	$y = 23,042x + 44,25$	0,98	1,25
Cao nước	$y = 23,991x + 9,24$	8,50	8,50
Acarbose	$y = 23,061x + 49,40$	0,13	0,13

Để đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase của các cao chiết, nghiên cứu tiến hành so sánh giá trị IC_{50} (hình 2). Chỉ số IC_{50} của Acarbose là 0,13 mg/mL, các cao phân đoạn ethyl acetat, n-butan và diclorometan có giá trị IC_{50} cao hơn, lần lượt là 0,39; 1,25 và 3,89 mg/mL. Giá trị IC_{50} của n-hexan và nước cao nhất là 7,12 và 8,50 mg/mL (hình 2). Acarbose là đối chứng, do đó có hoạt tính ức chế rất cao. Cao ethyl acetat có hoạt tính cao so với các cao phân đoạn còn lại với $IC_{50} = 0,39$

mg/mL và hơi thấp hơn so với đối chứng Acarbose. Cao n-butan và diclorometan cũng có hoạt tính ức chế nhưng thấp hơn so với ethyl acetat; hoạt tính thấp nhất đối với cao n-hexan và nước.



Hình 2. Chỉ số IC₅₀ ức chế α -glucosidase của Acarbose và cao phân đoạn

Kết quả của thí nghiệm giống với nghiên cứu của Ojo và cộng sự đã công bố. Trên các cao phân đoạn của lá cây Sống đời, cao ethyl acetat có hàm lượng polyphenol, flavonoid, tannin tổng và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase cao nhất, tiếp đến là cao n-butan [7]. Từ các nghiên cứu đã được công bố và kết quả của thí nghiệm trên cho thấy khả năng ức chế enzyme α -glucosidase tỷ lệ với hàm lượng polyphenol và flavonoid, nghĩa là những cao chiết giàu polyphenol và flavonoid có khả năng ức chế các enzyme càng mạnh.

4. Kết luận

Chiết cao từ bột lá cây Sống đời với cồn 96° và lactic phân đoạn, thu được các cao n-hexane, diclorometan, ethyl acetate, n-butan và cao nước để xác định hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase. Chỉ số IC₅₀ ức chế α -amylase của cao ethyl acetate, n-butan, n-hexan, nước và diclorometan lần lượt là 1,38; 2,27; 9,72; 10,96 và 11,63 mg/mL. Chỉ số IC₅₀ ức chế α -glucosidase của cao ethyl acetate, n-butan, diclorometan, n-hexan và nước lần lượt là 0,40; 1,25; 3,89; 7,12 và 8,50 mg/mL. Chỉ số IC₅₀ ức chế α -amylase và α -glucosidase của các phân đoạn cao chiết bột lá cây Sống đời thấp hơn so với Acarbose.

Đề có cơ sở tuyển chọn nguồn dược liệu có chất lượng cung cấp cho việc nghiên cứu các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ, cần tiếp tục đánh giá thêm hiệu quả tác động của cao chiết ethyl acetat và n-butanol từ bột lá cây Sống đời.

Lời cảm ơn

Kinh phí được tài trợ bởi trường Đại học Nguyễn Tất Thành, TP. HCM, Việt Nam trong khuôn khổ đề tài số 2022.01.095.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] World Health Organization, "Diabetes," 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. [Accessed Apr. 30, 2023].
- [2] A. S. Alqahtani, S. Hidayathulla, M. T. Rehman, A. A. ElGamal, S. Al-Massarani, V. Razmovski-Naumovski, M. S. Alqahtani, R. A. El Dib, and M. F. AlAjmi, "Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-Oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*," *Biomolecules*, vol. 10, no. 1, p. 61, 2019.
- [3] T. Q. Do, H. S. Bui, V. N. Vu, and T. D. H. Le, "Potent natural inhibitors of alpha-glucosidase and the application of *Aspergillus* spp. in diabetes type 2 drugs: a Review," *VNU Journal of Science*, vol. 38, no. 1, pp. 11-25, 2022.

-
- [4] F. Alam, Z. Shafique, and S. T. Amjad, "Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review," *Phytotherapy Research*, vol. 33, pp. 41-54, 2019.
- [5] R. Tundis, M. R. Loizzo, and F. Menichini, "Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 315-331, 2010.
- [6] D. D. Indah, "The antidiabetic activity of Cocor Bebek leaves' (*Kalanchoe pinnata* Lam.Pers.) ethanolic extract from various areas," *The Journal of Tropical Life Science*, vol. 2, pp. 37-39, 2012.
- [7] O. O. Adeleke, O. A. Busola, A. B. Olaitan, O. Oluranti, A. Ayodeji, O. Oyindamola, A. O. Olufisayo, I. Olajumoke, O. Oluwaseun, O. Tajudeen, A. Joseph, and O. B. Emmanuel, "Inhibitory effect of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken leaf extract and their fractions on α -amylase, α -glucosidase and cholinesterase enzyme," *Pharmacognosy Journal*, vol. 10, no. 3, pp. 497-506, 2017.
- [8] D. H. Bich, *The medicinal plants and animals in Vietnam*, vol. 2 (in Vietnamese), Science and Technics Publishing House, 2006, pp. 912-914.
- [9] A. L. Agüero-Hernández, "Hypoglycemic effect of *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. leaf extract," *Pharmacognosy Journal*, vol. 12, no. 3, pp. 557-561, 2020.
- [10] T. L. T. Nguyen and T. T. Tran, "Study on dried extract from *Coix lachryma-jobi* trunk by spray-drying method without using carrier," *Can Tho Journal of Medicine and Pharmacy*, vol. 22-23-24-25, pp. 1-5, 2019.
- [11] Q. D. Le, M. C. Nguyen, and P. T. Nguyen, "Screening α -amylase and α -glucosidase inhibitor activities of traditional medical plants in diabetes treatment," *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 2016, pp. 139-147, 2016.
- [12] N. K. P. Phung, *Techniques for extraction and isolation of natural products*. Vietnam National University, Ho Chi Minh City, 2022.
- [13] Ministry of Health, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, vol. 2, Appendix 8, Medical Publishing House, 2017.
- [14] *National Pharmacopoeia*, "Medical treatise, Acarbose," 2018. [Online]. Available: <https://duocthuquocgia.com/acarbose/>. [Accessed Nov. 30, 2022].