

INVESTIGATION OF ALPHA-GLUCOSIDASE AND ALPHA-AMYLASE INHIBITORY EFFECT OF EXTRACTS FROM LEAF *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Vo Thi Ngoc My*, Nguyen Thi Yen Linh, Nguyen Thanh Nga, Le Thu Thuy

Nguyen Tat Thanh University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/11/2023	The study's aims are investigating α -glucosidase and α -amylase inhibitory effect of extract from leaf of <i>H. rosa-sinensis</i> to orientate products that help reduce blood sugar level. Ethanol 70% extract and aqueous extract were used to investigate the enzyme inhibitory effect compared with the acarbose. Investigation of α -glucosidase inhibitory effect was measured a quantity of p-nitrophenol at 405 nm, which was created from pNPG. Investigation of α -amylase inhibitory effect was measured at 660 nm based on the difference in the initial amount of starch and amount of starch remaining. For α -glucosidase inhibitory effect, the IC_{50} result of the aqueous and the ethanol 70% extract were 1.42 ± 0.04 mg/ml and 1.19 ± 0.03 mg/ml, respectively. That was 2.68 and 2.25 times higher than acarbose ($IC_{50} = 0.53 \pm 0.01$ mg/ml). For the α -amylase inhibitory effect, the IC_{50} result of the aqueous and the ethanol 70% extract were 1.11 ± 0.02 mg/ml and 0.93 ± 0.01 mg/ml, respectively. These metrics were higher 2.92 and 2.45 times, respectively than acarbose ($IC_{50} = 0.38 \pm 0.02$ mg/ml). The results demonstrated that the aqueous and ethanol 70% extracts from leaf <i>H. rosa-sinensis</i> had inhibited the ability to inhibit α -glucosidase and α -amylase. The study opened up the potential for developing products to support diabetes treatment.
Revised: 05/3/2024	
Published: 11/3/2024	
KEYWORDS	
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	
Ethanol	
Alpha-glucosidase	
Alpha-amylase	
Diabetes	

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYM ALPHA-GLUCOSIDASE VÀ ENZYM ALPHA-AMYLASE CỦA DỊCH CHIẾT LÁ DÂM BỤT (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

Võ Thị Ngọc Mỹ*, Nguyễn Thị Yến Linh, Nguyễn Thanh Nga, Lê Thu Thủy

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/11/2023	Nghiên cứu này khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase và enzym α -amylase của cao chiết lá Dâm bụt định hướng sản phẩm hỗ trợ hạ đường huyết. Cao chiết ethanol 70% và cao chiết nước của lá Dâm bụt được sử dụng để khảo sát hoạt tính ức chế enzym so với chứng dương là acarbose. Tác động ức chế α -glucosidase được xác định ở bước sóng $\lambda = 405$ nm dựa vào p-nitrophenol tạo thành từ pPNG trong phản ứng. Tác động ức chế α -amylase được xác định ở bước sóng $\lambda = 660$ nm dựa vào sự chênh lệch lượng tinh bột ban đầu và lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Đối với hoạt tính ức chế α -glucosidase cho kết quả IC_{50} của cao nước và cao ethanol 70% lần lượt là $1,42 \pm 0,04$ mg/ml và $1,19 \pm 0,03$ mg/ml cao hơn 2,68 và 2,25 lần so với đối chứng acarbose là $0,53 \pm 0,01$ mg/ml. Đối với hoạt tính ức chế α -amylase cho kết quả IC_{50} của cao nước và cao ethanol 70% là $1,11 \pm 0,02$ mg/ml và $0,93 \pm 0,01$ mg/ml cao hơn 2,92 và 2,45 lần so với đối chứng acarbose là $0,38 \pm 0,02$ mg/ml. Kết quả chứng minh cao ethanol 70% và cao nước lá Dâm bụt có khả năng ức chế tốt trên cả hai enzym α -glucosidase và α -amylase. Nghiên cứu mở ra tiềm năng trong việc phát triển các sản phẩm hỗ trợ điều trị đái tháo đường.
Ngày hoàn thiện: 05/3/2024	
Ngày đăng: 11/3/2024	
TỪ KHÓA	
Dâm bụt <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	
Ethanol	
Alpha-glucosidase	
Alpha-amylase	
Đái tháo đường	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9179>

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

1. Mở đầu

Dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) thuộc họ Bông (Malvaceae), có nguồn gốc từ Trung Quốc, sau đó được nhân trồng làm cảnh ở khắp châu Á và rất phổ biến ở Việt Nam. Từ lâu, Dâm bụt được dùng để thanh nhiệt giải độc, chữa kiết lỵ... Cả lá, hoa và rễ đều có tác dụng chữa bệnh [1]-[5].

Lá Dâm bụt chứa các nhóm hợp chất chính bao gồm: alkaloid [1], flavonoid [1], [2], glycosid [1], [2], polyphenol [1], [2], saponin [2], tannin [1], [2], terpenoid [1], quinin [2], chất nhầy [1], [3], β -sitosterol [4]. Đây là loài dược liệu có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa, hạ đường huyết, hạ lipid huyết và chữa lành vết thương [5]-[10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về thành phần hóa học, tác dụng dược lý ứng dụng về Dâm bụt vẫn còn hạn chế cả trong và ngoài nước.

Nghiên cứu này khảo sát hoạt tính ức chế alpha-glucosidase và ức chế alpha-amylase nhằm đánh giá khả năng hạ đường huyết từ cao chiết lá Dâm bụt giúp tìm ra nguồn dược liệu vừa an toàn vừa có tác dụng hỗ trợ hạ đường huyết; Từ đó, cung cấp thêm thông tin khoa học về công dụng của lá Dâm bụt.

2. Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Lá Dâm bụt tươi, xanh, sạch bệnh được hái vào tháng 5/2023 tại quận 7, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Lá được rửa sạch, sấy khô và xay nhỏ đến độ mịn thích hợp sau đó bảo quản tránh ảnh hưởng của hơi nước trong không khí. Hình ảnh lá Dâm bụt và bột lá được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Lá Dâm bụt (A) và bột lá Dâm bụt (B)

Hóa chất, dụng cụ

Hóa chất: Alpha-glucosidase, alpha-amylase, acarbose, dimethyl sulfoxid (DMSO), đệm phosphat,...do Merck cung cấp; nước cất, ethanol 70% (EtOH 70%) của Trung Quốc.

Dụng cụ: Đĩa 96 giếng, micropipet và các dụng cụ cơ bản dùng trong thí nghiệm: bình định mức, cốc có mỏ, ống nhỏ giọt,...

Thiết bị: Máy cô quay chân không, bếp cách thủy, máy đo OD,...

Phương pháp nghiên cứu

Định danh dược liệu: Định danh cây Dâm bụt bằng phương pháp ADN: Khuếch đại một phần vùng gen RbcL và BLAST đối chiếu trên ngân hàng gen NCBI.

Chiết xuất dược liệu:

- Dung môi ethanol 70%: 100 g dược liệu được chiết bằng phương pháp chiết nóng ở 70°C với 2000 ml EtOH 70% trong 2 giờ. Lọc và thu được dịch chiết lặp lại quy trình 2 lần. Tất cả dịch chiết được cô cạn trên máy cô quay và đun cách thủy ở 55°C cho đến khi thành cao đặc (độ ẩm 5-20%), cao được bảo quản ở nhiệt độ 2-5°C [9].

- Dung môi nước cất: 100 g dược liệu được chiết bằng phương pháp chiết nóng ở 70°C với 2000 ml nước cất trong 2 giờ, lọc và thu dịch chiết. Chất nhầy trong dịch chiết được loại bỏ bằng cách thêm 500 ml cồn cao độ, lọc và phân tách dịch nhầy và dịch lỏng. Quy trình được lặp lại 2 lần. Dịch lỏng được cô cạn bằng máy cô quay và đun cách thủy ở 55°C cho đến khi thành cao đặc (độ ẩm 5-20%), cao chiết được bảo quản ở nhiệt độ 2-5°C [9].

- Hiệu suất chiết

Hiệu suất thu hồi cao (%) được tính theo công thức [10]:

$$\text{Hiệu suất} = \frac{\text{Khối lượng cao thu được} \times (100 - \text{độ ẩm cao thu được})}{\text{Khối lượng dược liệu đem thử} \times (100 - \text{độ ẩm của dược liệu})} \times 100$$

Định tính sơ bộ hóa thực vật

Sử dụng cao chiết EtOH 70% và cao chiết nước lá Dâm bụt để khảo sát thành phần hóa học theo phương pháp Ciule đã được cải tiến bởi Đại học Y Dược Tp.HCM [11].

Khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase

Cao EtOH 70% và cao nước lá được pha loãng thành các mức nồng độ 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 mg/mL. Enzym α -glucosidase được pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 thành nồng độ 0,2 U/mL. 50 μ L α -glucosidase ủ với cao chiết ở các mức nồng độ khác nhau, sau đó 50 μ L đệm phosphate được thêm vào hỗn hợp và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Tiếp theo, cho vào hỗn hợp phản ứng 50 μ L p-PNG nồng độ 0,1 mg/mL và ủ ở nhiệt độ 37°C với thời gian 30 phút. Sau cùng, bổ sung 100 μ L Na₂CO₃ 0,2 M để kết thúc phản ứng. Hoạt động ức chế của enzym α -glucosidase được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng λ = 405 nm. Song song đó, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzym α -glucosidase với đối chứng là acarbose ở các mức nồng độ tương ứng được trình bày ở Bảng 1. Phần trăm enzym α -glucosidase bị ức chế (%) được tính dựa vào lượng p-nitrophenol tạo thành từ pPNG trong phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thụ quang phổ [12].

Bảng 1. Tiến hành khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase

μ L	Thử	Chứng thử	Chuẩn	Trắng
Cao chiết/ Acarbose	50	50		
Enzym	50		50	
Đệm	50	50	50	50
		Ủ 37°C trong 30 phút		
p-PNG	50	50	50	50
		Ủ 37°C trong 30 phút		
Na ₂ CO ₃	100	100	100	100

Phần trăm enzym α -glucosidase bị ức chế được tính theo công thức:

$$I = \left[\frac{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}}) - (A_{\text{thử}} - A_{\text{chứng thử}})}{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}})} \right] \times 100$$

Trong đó:

I: Phần trăm enzym α -glucosidase bị ức chế (%)

A: Độ hấp thụ

IC₅₀ được xác định bằng cách vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa giá trị phần trăm enzym α -glucosidase bị ức chế theo nồng độ C với phần mềm Excel ta được phương trình logarithm có dạng $y = ax + b$, với $y = 50$.

Khảo sát khả năng ức chế enzym α -amylase

Cao EtOH 70% và cao nước lá được pha loãng thành các nồng độ 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 mg/mL. Enzym α -amylase được pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 6,8 thành nồng độ 0,2 U/mL. 20 μ L enzym α -amylase được ủ với 50 μ L cao chiết ở các nồng độ khác nhau, sau đó 20 μ L đệm phosphate được thêm vào hỗn hợp và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Tiếp theo, cho vào hỗn hợp phản ứng 70 μ L tinh bột 1 mg/ mL và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào 70 μ L thuốc thử Iod 0,1N để nhận biết lượng tinh bột còn lại dựa trên phản ứng màu xanh đặc trưng của phức hợp tinh bột-iod. Hỗn hợp được đo quang phổ ở bước sóng λ = 660 nm để xác định lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Song song đó, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzym α -amylase với đối chứng dương là acarbose ở các mức nồng độ tương ứng được trình bày ở Bảng 2. Phần trăm enzym 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 [12].

Bảng 2. Tiến hành khảo sát khả năng ức chế enzym α -amylase

μL	Thử	Chứng thử	Chuẩn	Trắng
Cao chiết/ Acarbose	50	50		
Enzym	20	20		
Đệm	20	20	20	20
		Ủ 37°C trong 10 phút		
Tinh bột	70		70	
		Ủ 37°C trong 10 phút		
Iod	70	70	70	70

$$\text{Hiệu suất phản ứng (\%)} = 100 - \left[\frac{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}}) - (A_{\text{thử}} - A_{\text{chứng thử}})}{(A_{\text{chuẩn}} - A_{\text{trắng}})} \right] \times 100$$

Trong đó:

A_0 : Độ hấp thụ

IC_{50} : Được xác định bằng cách vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa giá trị phần trăm enzym α -amylase bị ức chế theo nồng độ C với phần mềm Excel ta được phương trình logarithm có dạng $y = ax + b$, với $y = 50$.

Phân tích thống kê kết quả

Các số liệu được trình bày ở dạng số trung bình $\pm$ SEM (Standard error of mean – sai số chuẩn của số trung bình). Sự khác biệt giữa các lô thử, lô đối chứng so với lô chứng được kiểm tra, phân tích bằng phép kiểm MannWhitney với phần mềm SPSS 20.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định danh dược liệu

Mẫu lá định danh bằng phương pháp khuếch đại một vùng gen *RbcL* và so sánh với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả cho thấy mẫu lá định danh thuộc loài *H. rosa-sinensis* với mức độ tương đồng là 99,82% được trình bày trong Hình 2.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hibiscus rosa-sinensis chloroplast, complete genome	Hibiscus rosa-si...	1022	1022	99%	0.0	99.82%	160951	NC_042239.1	
Hibiscus rosa-sinensis voucher MA-09 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	Hibiscus rosa-si...	1022	1022	99%	0.0	99.82%	728	MH588538.1	
Hibiscus rosa-sinensis voucher MA-08 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	Hibiscus rosa-si...	1022	1022	99%	0.0	99.82%	673	MH588537.1	
Hibiscus rosa-sinensis voucher MA-06 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	Hibiscus rosa-si...	1022	1022	99%	0.0	99.82%	711	MH588535.1	
Hibiscus rosa-sinensis voucher MA-04 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	Hibiscus rosa-si...	1022	1022	99%	0.0	99.82%	699	MH588534.1	

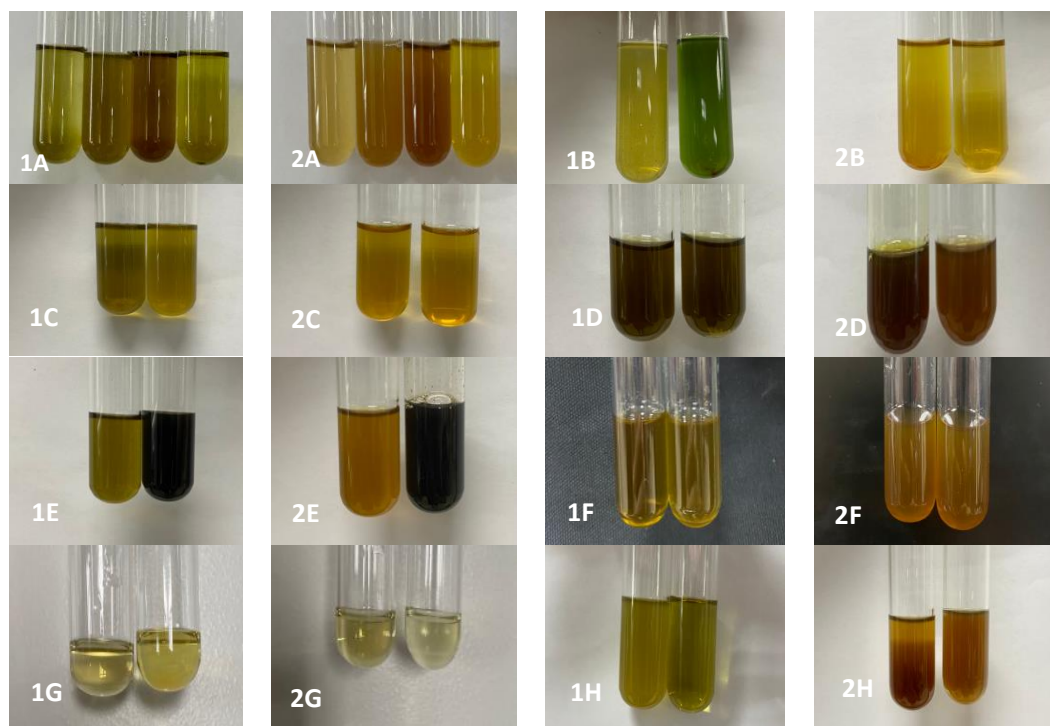
Hình 2. Top 5 kết quả cho kết quả có độ tương đồng cao (>99%)

Trình tự khảo sát tương đồng với các trình tự trên ngân hàng NCBI như sau:

1. *Hibiscus rosa-sinensis* chloroplast, complete genome (99,82% tương đồng).
2. *Hibiscus rosa-sinensis* voucher MA-09 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast (99,82% tương đồng).
3. *Hibiscus rosa-sinensis* voucher MA-08 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast (99,82% tương đồng).

3.2. Định tính sơ bộ hóa thực vật

Từ cao nước và cao EtOH 70% tiến hành sơ bộ hóa thành phần hóa học có trong hai loại cao chiết. Hình ảnh của các thí nghiệm định tính được trình bày trong Hình 3 và Bảng 3.



Hình 3. Kết quả khảo sát thành phần hóa học của cao nước và cao EtOH 70%

A. Alkaloid (Dragendorff-Bouchardat-Hager), B. Các hợp chất khử (đường khử), C. Flavonoid, D. Các acid hữu cơ, E. Các hợp chất polyphenol, F. Tannin, G. Anthraquinon, H. Saponin.
(1. Cao chiết Ethanol 70%; 2. Cao chiết nước)

Bảng 3. Kết quả khảo sát thành phần hóa học của các cao chiết lá Dâm bụt

STT	Nhóm hợp chất	Thuốc thử (TT)	Hiện tượng	Kết quả		Kết luận	
				Cao nước	Cao EtOH 70%	Cao nước	Cao EtOH 70%
1	Alkaloid	TT Dragendorff	Tủa màu vàng cam đỏ	+	+	Có alkaloid	
		TT Bouchardat	Tủa màu nâu	+	+		
		TT Hager	Tủa màu vàng	+	+		
2	Flavonoid	TT bột Mg + HCl đậm đặc	Dung dịch có màu từ hồng đến đỏ	+	+	Có flavonoid	
3	Saponin	Phản ứng tạo bọt	Không có bọt bền trong 15 phút	-	-	Không có saponin	
4	Tanin	TT gelatin muối	Không có tủa trắng đục	-	-	Không có tannin	
5	Các hợp chất polyphenol	TT FeCl ₃ 5%	Dung dịch có màu xanh đen	+	+	Có polyphenol	
6	Các hợp chất khử	Fehling A + Fehling B	Kết tủa đỏ gạch	+	+	Có các chất khử	
7	Các acid hữu cơ	Tinh thể natri carbonat	Không có bọt khí sủi lên	-	-	Không có các acid hữu cơ	
8	Anthraquinon	TT NaOH 10%	Không có lớp kiềm từ hồng đến đỏ	-	-	Không có anthraquinon	

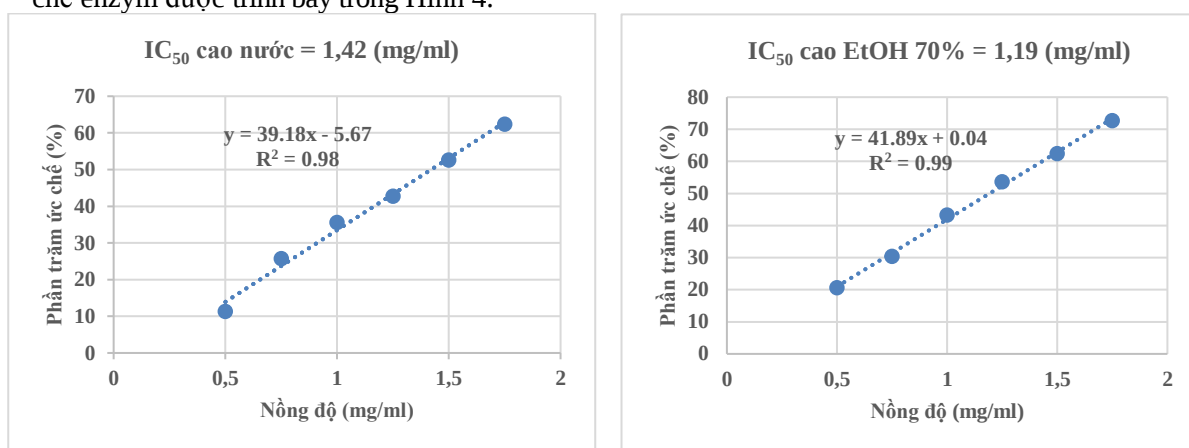
Kết quả khảo sát thành phần hóa học có trong cao EtOH 70% và cao nước cho kết quả tương đồng nhau, đều cho thấy sự hiện diện của các hợp chất: alkaloid, flavonoid, chất nhầy, các hợp chất polyphenol, các hợp chất khử (đường khử). Kết quả khá tương đồng với các nghiên cứu trước đây về loài này [4], [13]. Alkaloid, flavonoid và một số polyphenol theo nghiên cứu của Adhikari [14], Ghorbani [15] và Xiao [16] có tiềm năng trong điều trị đái tháo đường. Theo

nghiên cứu của Khaga Raj Sharma cho thấy, trong dịch chiết methanol 80% có tanin, tuy nhiên trong cả hai cao chiết trong nghiên cứu này không có thành phần này. Sự khác biệt có thể lý giải do sự khác nhau về địa lý, khí hậu, thời điểm thu hái và dung môi chiết lá Dâm bụt [13].

3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Cao EtOH 70%, cao nước được sử dụng để khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase. Các số liệu của nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm SPSS phiên bản 20.0.

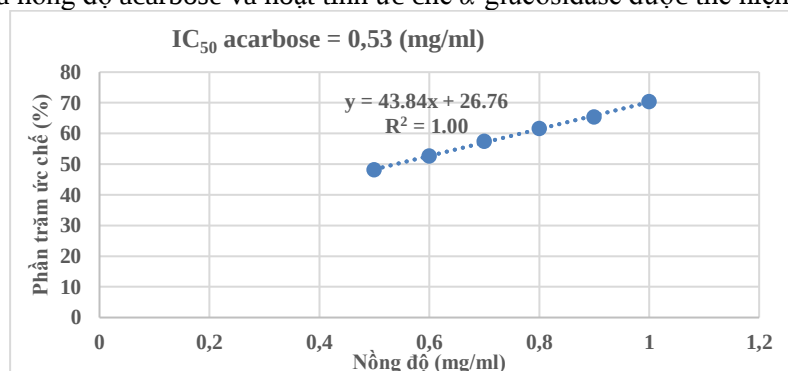
Dựa vào kết quả ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết lá Dâm bụt với đối chứng là acarbose tiến hành xây dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và hoạt tính ức chế enzym được trình bày trong Hình 4.



Hình 4. Đường chuẩn giữa nồng độ cao chiết nước và EtOH lá Dâm bụt và hoạt tính ức chế α -glucosidase

Qua kết quả ức chế α -glucosidase cho thấy phần trăm ức chế (I%) của cả hai cao chiết đều gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Dãy nồng độ tiến hành khảo sát enzym của hai cao chiết là 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 mg/ml. Ở cùng một nồng độ, I% của cao EtOH 70% tốt hơn cao nước. Ở nồng độ 1,75 mg/ml cao EtOH 70%, cao nước cho I% lần lượt là $72,65 \pm 1,73\%$; $62,37 \pm 0,41\%$. Điều này cho thấy cao nước và cao ethanol 70% cho khả năng ức chế tốt enzym α -glucosidase có tiềm năng trong việc phát triển sản phẩm hỗ trợ hạ đường huyết.

Kết quả ức chế hoạt tính α -glucosidase của hai cao chiết được so với chứng dương là acarbose. Acarbose là thuốc điều trị đái tháo đường tuýp 2 phổ biến trên thị trường. Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ acarbose và hoạt tính ức chế α -glucosidase được thể hiện qua Hình 5.



Hình 5. Đường chuẩn giữa nồng độ acarbose và hoạt tính ức chế α -glucosidase

Qua đường chuẩn cho thấy phần trăm ức chế enzym α -glucosidase của acarbose gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Phương trình đường thẳng $y = 43,84x + 26,76$ với hệ số tương quan $R^2 = 1,00$ và giá trị $IC_{50} = 0,53 \pm 0,01$ mg/ml. Ở nồng độ 0,5 mg/ml, acarbose ức chế được $48,07 \pm 2,04\%$ glucosidase. Ở nồng độ 1,75 mg/ml, acarbose ức chế được $70,23 \pm 3,63\%$ glucosidase.

Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Phương trình đường thẳng và hệ số IC_{50} của các cao chiết và acarbose

Thông số/Tên	Cao nước	Cao EtOH 70%	Acarbose
Phương trình	$y = 39,18x - 5,67$ ($R^2 = 0,98$)	$y = 41,89x + 0,04$ ($R^2 = 0,99$)	$y = 43,84x + 26,76$ ($R^2 = 1,00$)
IC_{50} (mg/ml)	$1,42^c \pm 0,04$	$1,19^b \pm 0,03$	$0,53^a \pm 0,01$

Các giá trị trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Cao chiết EtOH 70% và cao chiết nước của lá Dâm bụt đều cho khả năng ức chế tốt trên enzym α -glucosidase. Nồng độ càng cao sẽ cho khả năng ức chế càng cao. Ở cùng một nồng độ là 1,75 mg/ml, cao EtOH 70% ức chế được 72,65% glucosidase, cao nước ức chế được 62,37% glucosidase. IC_{50} của hai loại cao chiết lần lượt là $1,19 \pm 0,03$ mg/ml; $1,42 \pm 0,04$ mg/ml. Kết quả ức chế cho thấy cao EtOH 70% có khả năng ức chế cao hơn cao nước. Kết quả khảo sát thành phần hóa học cho thấy cao EtOH 70% và cao nước đều cho phản ứng dương tính với alkaloid, flavonoid và hợp chất polyphenol. Theo nghiên cứu của Adhikari [14], Ghorbani [15] và Xiao [16] cho thấy hợp chất này có tiềm năng trong hạ đường huyết. Cao EtOH 70% cho phản ứng với alkaloid rõ ràng hơn.

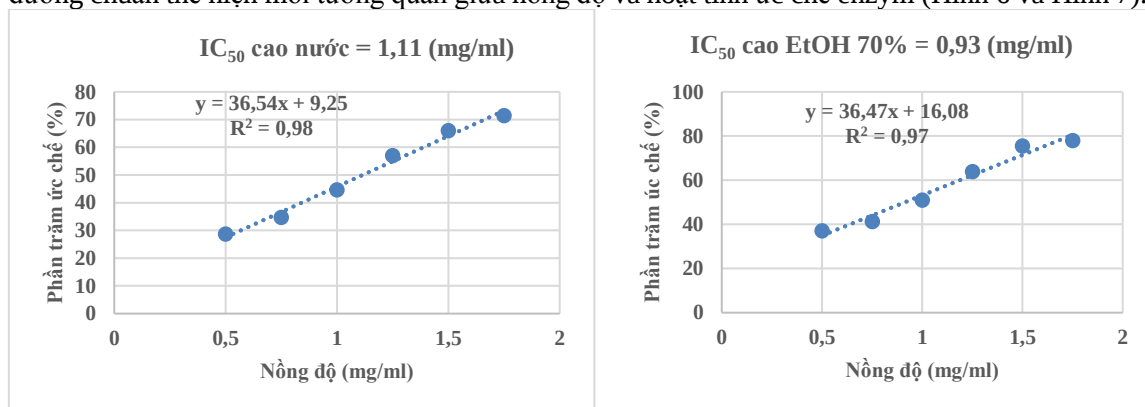
Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Pereira và cộng sự về khả năng ức chế α -glucosidase của Búp giấm (*H. sabdariffa*) cho thấy IC_{50} của cao chiết nước Búp giấm là $187,9 \pm 10,2$ μ g/ml [17]. Sự khác biệt này do được liệu và quy trình chiết xuất khác nhau. Nghiên cứu này sử dụng acarbose làm đối chứng, khả năng ức chế α -glucosidase cũng gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Ở nồng độ 1,0 mg/ml ức chế được 70,23% glucosidase và IC_{50} của acarbose được xác định là $0,54 \pm 0,01$ mg/ml.

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao nước và cao EtOH 70% có khả năng ức chế tốt enzym α -glucosidase. IC_{50} của cao ethanol 70% và cao nước lần lượt gấp 2,25 lần và 2,68 lần so với đối chứng acarbose. Nghiên cứu này góp phần cung cấp cơ sở khoa học chứng minh tác dụng hỗ trợ hạ đường huyết của lá Dâm bụt, có tiềm năng trong việc điều chế các sản phẩm hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

3.4. Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzym α -amylase

Cao EtOH 70% và cao nước được sử dụng để khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -amylase. Kết quả ức chế hoạt tính α -amylase được so với chứng dương là acarbose.

Dựa vào kết quả ức chế enzym α -amylase của cao chiết lá Dâm bụt và acarbose tiến hành dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và hoạt tính ức chế enzym (Hình 6 và Hình 7).

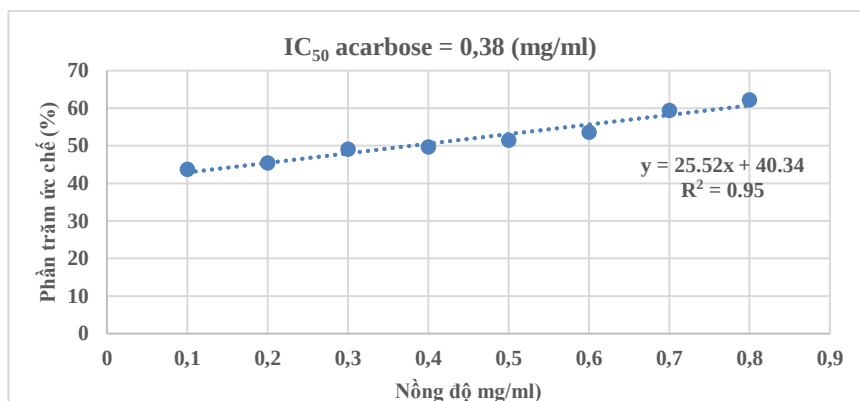


Hình 6. Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ cao nước và cao EtOH 70% lá Dâm bụt và hoạt tính ức chế α -amylase

Qua đường chuẩn cho thấy phần trăm ức chế enzym α -amylase của cao nước lá Dâm bụt gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Phương trình đường thẳng $y = 36,54x + 9,25$ với hệ số tương quan

$R^2 = 0,98$ và giá trị $IC_{50} = 1,11 \pm 0,02$ mg/ml. Phần trăm ức chế enzyme α -amylase của cao EtOH 70% lá Dâm bụt gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Phương trình đường thẳng $y = 36,47x + 16,08$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,97$ và giá trị $IC_{50} = 0,93 \pm 0,01$ mg/ml. Cao nước và EtOH 70% của lá Dâm bụt có hoạt tính ức chế tốt α -amylase và khả năng ức chế α -amylase của cả hai loại cao chiết gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Dãy nồng độ tiến hành khảo sát enzyme của hai loại cao là 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 mg/ml. Ở cùng một nồng độ, phần trăm ức chế (I%) của ethanol 70% tốt hơn cao nước. Ở nồng độ 1,75 mg/ml, cao ethanol 70%, cao nước cho I% lần lượt là $78,12 \pm 0,66\%$; $71,48 \pm 1,04$. Điều này cho thấy cao nước và cao EtOH 70% cho khả năng ức chế tốt enzyme α -amylase có tiềm năng trong việc phát triển sản phẩm hỗ trợ hạ đường huyết.

Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ acarbose và hoạt tính ức chế α -amylase thể hiện qua Hình 7.



Hình 7. Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ acarbose và hoạt tính ức chế α -amylase

Qua đường chuẩn cho thấy phần trăm ức chế enzyme α -amylase của acarbose gia tăng tuyến tính theo nồng độ. Phương trình đường thẳng $y = 25,52x + 40,34$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,95$ và giá trị $IC_{50} = 0,38 \pm 0,02$ mg/ml. Ở nồng độ 0,1 mg/ml acarbose ức chế được $43,76 \pm 0,57\%$ amylase. Ở nồng độ 0,8 mg/ml, ức chế được $62,22 \pm 0,82\%$ amylase. Thông số về phương trình đường thẳng và hệ số IC_{50} của các cao chiết và acarbose được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Phương trình đường thẳng và hệ số IC_{50} của các cao chiết và acarbose

Thông số	Cao nước	Cao EtOH 70%	Acarbose
Phương trình	$y = 36,54x + 9,25$ ($R^2 = 0,99$)	$y = 36,47x + 16,68$ ($R^2 = 0,97$)	$y = 25,52x + 40,34$ ($R^2 = 0,95$)
IC_{50} (mg/ml)	$1,11^c \pm 0,02$	$0,93^b \pm 0,01$	$0,38^a \pm 0,02$

Các giá trị trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$

Khả năng ức chế α -amylase của cao EtOH 70% và cao nước cho kết quả khá tương đồng với α -glucosidase. Kết quả ức chế cho thấy cao EtOH 70% có khả năng ức chế cao hơn cao nước. Ở cùng một nồng độ 1,75 mg/ml, cao EtOH 70% và cao nước ức chế lần lượt là 78,12%; 71,48% và 40,50% amylase. IC_{50} của hai loại cao chiết lần lượt là $0,93 \pm 0,01$ mg/ml; $1,11 \pm 0,02$ mg/ml. Kết quả khảo sát thành phần hóa học cho thấy cao EtOH 70% và cao nước đều cho phản ứng dương tính với alkaloid, flavonoid và hợp chất polyphenol. Theo nghiên cứu của Adhikari [14], Ghorbani [15] và Xiao [16] cho thấy hợp chất này có tiềm năng trong hạ đường huyết. Cao EtOH 70% cho phản ứng với alkaloid rõ ràng hơn. So sánh với nghiên cứu của Pereira và cộng sự về khả năng ức chế α -amylase của Búp giấm (*H. sabdariffa*) cho thấy IC_{50} của chiết xuất nước Búp giấm là $25,2 \pm 2,4$ μ g/ml [17]. Sự khác biệt này do được liệu và quy trình chiết xuất khác nhau. Nghiên cứu này cũng sử dụng acarbose làm đối chứng. IC_{50} của acarbose được xác định là $0,38 \pm 0,02$ mg/ml và ở nồng độ 0,8 mg/ml ức chế được 62,22% amylase.

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết nước và ethanol 70% có khả năng ức chế tốt trên enzyme α -amylase. IC_{50} của cao ethanol 70% và cao nước lần lượt gấp 2,45 lần và 2,95 lần so với đối chứng acarbose.

Qua kết quả khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase và enzym α -amylase cho thấy cao EtOH 70% và cao nước có khả năng ức chế tốt trên cả hai enzym. Cao nước Dâm bụt đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ gan và thận ở chuột mắc bệnh tiểu đường gây ra bằng thực nghiệm. Ở đây, hai hợp chất orientin (luteolin-8-C-glucosid) và verbascosid (phenylpropanoid glycosid) đã được phân lập từ Dâm bụt. Hai hợp chất được xác định bằng phân tích quang phổ [18]. Những kết quả này chỉ ra rằng cao nước lá của Dâm bụt có tác dụng trị đái tháo đường và hạ đường huyết ở chuột mắc bệnh tiểu đường.

4. Kết luận

Theo kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử cho thấy mẫu lá định danh thuộc loài *H. rosa-sinensis* với mức độ tương đồng là 99,82%. Cao ethanol 70% và cao nước của lá Dâm bụt có độ ẩm lần lượt là 15,31% và 13,6% (<20%) phù hợp với tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V. Cao ethanol 70% và cao nước cho khả năng ức chế α -glucosidase tốt thể hiện qua hệ số IC_{50} lần lượt là $1,19 \pm 0,03$ mg/ml và $1,42 \pm 0,04$ mg/ml so với đối chứng acarbose $IC_{50} = 0,53 \pm 0,01$ mg/ml. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khả năng ức chế α -amylase tốt của cao ethanol 70% và cao nước thể hiện qua hệ số IC_{50} lần lượt là $0,93 \pm 0,01$ mg/ml và $1,11 \pm 0,02$ mg/ml so với đối chứng acarbose $IC_{50} = 0,38 \pm 0,02$ mg/ml. Nghiên cứu này góp phần cung cấp cơ sở khoa học chứng minh tác dụng hỗ trợ hạ đường huyết của lá Dâm bụt, có tiềm năng trong việc điều chế trà hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Patel and M. Adhav, "Comparative phytochemical screening of ethanolic extracts (flower and leaf) of morphotypes of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn.," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 5, no. 3, pp. 93-95, 2016.
- [2] K. R. Sharma and K. Thakur, "Determination of Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant and α -Amylase Inhibitory Activity of Leaf and Flower Extracts of *Clerodendrum infortunatum* and *Hibiscus rosa sinensis* Growing in Bara Nepal," *Journal of Balkumari College*, vol. 11, no. 1, pp. 20-26, 2022.
- [3] N. M. Shimizu, I. T. Suzuki, and K. Takada, "Plant mucilages. XLII, A representative mucilage with biological activity from the leaves of *Hibiscus rosa sinensis*," *Biol Pharm Bull*, vol. 16, no. 8, pp. 735-739, 1993.
- [4] V. M. Jadhav, R. M. Thorat, V. J. Kadam, and N. S. Sathe, "*Hibiscus rosa sinensis* Linn – 'Rudrapuspa': A Review," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 2, no. 7, pp. 1168-1173, 2009.
- [5] T. M. N. Luong, T. K. L. Le, T. T. L. Nguyen, N. Q. Nguyen, T.T. L. Le, T. H. H. Truong, and T. H. Tran, "Study on the antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* L. leaf and flower extracts against *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*," *Science and technology development journal natural sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 19-26, 2018.
- [6] S. Mondal, D. Ghosh, N. Sagar, and S. Ganapaty, "Evaluation of antioxidant, toxicological and wound healing properties of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae) ethanolic leaves extract on different experimental animal models," *Indian J Pharm Edu Res*, vol. 50, no. 1, pp. 620-637, 2016.
- [7] L. H. Zaki, S. M. Mohamed, S. A. Bashandy, F. A. Morsy, K. M. Tawfik, and A. A. Shahat, "Hypoglycemic and antioxidant effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. leaves extract on liver and kidney damage in streptozotocin induced diabetic rats," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 11, no. 13, pp. 161-169, 2017.
- [8] V. Kumar, P. Singh, R. Chander, F. Mahdi, S. Singh, and R. Singh, "Hypolipidemic activity of *Hibiscus rosa sinensis* root in rats," *Indian J Biochem Biophys*, vol. 46, no. 6, pp. 507-510, 2009.
- [9] C. W. Cheng, S. M. Saad, and R. Abdullah, "Alternative staining using extracts of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and red beet (*Beta vulgaris* L.) in diagnosing ova of intestinal nematodes (*Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*)," *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, vol. 1, no. 5, pp. 14-18, 2014.
- [10] H. M. P. Le, T. A. L. Le, V. V. Doan, and V. C. Ngo, "Study on the antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam. leaves and branches extracts," *Journal of science of Lac Hong university*, vol. 12, pp. 072-075, 2021.

-
- [11] H. Tran, V. K. Nguyen *et al.*, "Methods of researching medicinal herbs", *Ho Chi Minh City Medicine and Pharmacy University*, pp. 2-126, 2015.
- [12] T. X. T. Dai, T. M. P. Nguyen, T. N. D. Vo, and T. H. Quach, "Studies on hypoglycemic and antioxidant activities of ethanolic extracts from *Morinda citrifolia* L. in diabetic mice," *CTU Journal of Science*, vol. 23b, pp. 115-124, 2012.
- [13] K. R. Sharma and K. Thakur, "Determination of Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant and α -Amylase Inhibitory Activity of Leaf and Flower Extracts of *Clerodendrum infortunatum* and *Hibiscus rosa sinensis* Growing in Bara Nepal," *Journal of Balkumari College*, vol. 11, no. 1, pp. 20-26, 2022.
- [14] B. Adhikari, "Roles of alkaloids from medicinal plants in the management of diabetes mellitus," *Journal of Chemistry*, vol. 2021, pp. 1-10, 2021.
- [15] A. Ghorbani *et al.*, "Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 96, pp. 305-312, 2017.
- [16] P. Tomasik and D. Horton, "Enzymatic conversions of starch," *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, vol. 68, pp. 59-436, 2012.
- [17] L. L. S. Pereira *et al.*, "Inhibition of digestive enzymes (α -amylase, α -glucosidase, lipase, trypsin) by aqueous *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) extract," *Revista Fitos. Rio de Janeiro*, vol. 16, no. 3, pp. 315-323, 2022.
- [18] L. H. Zaki, S. M. Mohamed, S. A. Bashandy, F. A. Morsy, K. M. Tawfik, and A. A. Shahat, "Hypoglycemic and antioxidant effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. leaves extract on liver and kidney damage in streptozotocin induced diabetic rats," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 11, no. 13, pp. 161-169, 2017.