

8. Nguyễn Thị Minh Thương, Hoàng Thị Thảo, Nguyễn Thị Minh Trâm, Hoàng Ánh Linh, Đặng Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Tính, et al. Thực trạng sử dụng đồ nhựa dùng một lần và một số yếu tố liên quan ở người dân thành phố Huế năm 2020. *Tạp chí Y học dự phòng*. 2021. 31(6), 105-9.
9. Nguyen Huy Nga, Tran Tuan Anh. Knowledge, attitudes and behaviour of Vietnamese people about single-use plastic products and health impacts in 2021. *Vietnam medical journal*. 2022. 58-64.
10. Nguyễn Trung Hoàng, Nguyễn Thị Lan Bình. Khảo sát thói quen sử dụng nhựa và đánh giá độ an toàn của các vật dụng nhựa sử dụng ở một số hộ gia đình tại quận Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí khoa học và Công nghệ*. 2021. 49, 222-39.
11. Khanam N., Wagh V., Gaidhane A., Quazi S. Knowledge, attitude and practice on uses of plastic products, their disposal and environmental pollution: A study among school-going adolescents. 2019. 14(2), 57-60, DOI: 10.4103/jdmimsu.jdmimsu_27_19
12. Hammami M. B. A., Mohammed E. Q., Hashem A. M., Al-Khafaji M. A., Alqahtani F., et al. Survey on awareness and attitudes of secondary school students regarding plastic pollution: implications for environmental education and public health in Sharjah city, UAE. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017. 24(25), 20626-33.
13. Shaira H., Ismail I. M., Ahmed N., Zeena N., Arooj P., et al. Assessment of Knowledge, Attitude and Practice Regarding Single Use Plastics among the Residents of a Rural Area in a Coastal District of Karnataka - A Descriptive Study. *National Journal of Community Medicine*. 2019. 11(2), 87-92, <https://doi.org/10.5455/njcm.20200207094558>

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨNG CHẾ ENZYM α -GLUCOSIDASE CỦA CAO CHIẾT DƯỢC LIỆU SỬ DỤNG MÁY QUANG PHỔ HAI CHÙM TIA

Lê Minh Luân, Võ Đức Linh, Nguyễn Ngọc Nhã Thảo*

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

**Email: nnnthao@ctump.edu.vn*

Ngày nhận bài: 31/5/2023

Ngày phản biện: 22/8/2023

Ngày duyệt đăng: 15/9/2023

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Các nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế men α -glucosidase của cao dược liệu thường sử dụng máy đo quang phổ 96 giếng. Với máy đo quang phổ 2 chùm tia thông thường thì điều kiện xử lý mẫu cần phải được xây dựng và đánh giá lại cho phù hợp để có thể ứng dụng đánh giá hoạt tính ức chế men α -glucosidase của cao dược liệu phục vụ cho mục đích nghiên cứu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng quy trình và đánh giá tác dụng ức chế men α -glucosidase in vitro của cao đặc lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh trên máy quang phổ hai chùm tia UV-VIS. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Cao đặc lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh. Đánh giá tác dụng ức chế men α -glucosidase của các cao chiết bằng phản ứng với cơ chất pNPG thông qua việc khảo sát các điều kiện về nồng độ enzyme, thời gian phản ứng và ảnh hưởng của chất đệm Na_2CO_3 , tiến

hành đo quang ở bước sóng 400nm sử dụng máy đo quang phổ hai chùm tia UV-VIS đồng thời ứng dụng quy trình đã xây dựng để khảo sát hoạt tính ức chế của ba loại cao đặc dược liệu lá Xoài, Giảo cổ lam và Dây thìa canh. **Kết quả:** Cao của ba loại dược liệu lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh và acarbose có tác dụng ức chế men α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là: $39,68 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$, $126,94 \pm 4,58 \mu\text{g/mL}$, $92,32 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$ và $176,09 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$. **Kết luận:** Đã xây dựng được quy trình đánh giá hoạt tính ức chế men α -glucosidase in vitro trên máy đo quang phổ hai chùm tia và cho kết quả các loại dược liệu lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh có khả năng ức chế men α -glucosidase.

Từ khóa: Lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh, α -glucosidase, in vitro.

ABSTRACT

DEVELOPING PROCESS FOR EVALUATING THE ENZYME α -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES OF HERBAL EXTRACT USING DUAL-BEAM SPECTROPHOTOMETER

Le Minh Luan, Vo Duc Linh, Nguyen Ngoc Nha Thao*

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Studies evaluating the α -glucosidase inhibitory activity of medicinal herbs often use a 96-well spectrophotometer. With a conventional 2-beam spectrophotometer, the sample processing conditions need to be developed and re-evaluated to be able to evaluate the α -glucosidase inhibitory activity of herbal extracts for research purposes. **Objectives:** To develop a procedure and evaluate the inhibitory effect of α -glucosidase in vitro of mango leaf extract, jiaogulan leaf extract and gymnema extract on a UV-VIS dual beam spectrophotometer. **Materials and methods:** Mango leaf extract, jiaogulan leaf extract and gymnema extract. Evaluation of the α -glucosidase inhibitory effect of the extracts by reacting with pNPG substrate consist of investigating the conditions of enzyme concentration, reaction time and influence of Na_2CO_3 buffer, conducting photometric measurements at 400nm wavelength using UV-VIS dual-beam spectrophotometer and applying the developed procedure to investigate the inhibitory activities of three special medicinal extracts of mango, jiaogulan and gymnema leaves. **Results:** The extracts of three medicinal herbs, mango, jiaogulan, gymnema and acarbose inhibited α -glucosidase with IC_{50} values of $39.68 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$, $126.94 \pm 4.58 \mu\text{g/mL}$, $92.32 \pm 0.97 \mu\text{g/mL}$ and $176.09 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusions:** A procedure for evaluating α -glucosidase inhibitory activity in vitro on a dual-beam spectrophotometer has been developed and the results showed that the medicinal herbs of mango leaves, jiaogulan, and gymnema have the potential α -glucosidase inhibitor.

Keywords: Mango leaves, Jiaogulan, Gymnema, α -glucosidase, in vitro.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Liên đoàn Đái tháo đường Quốc tế IDF năm 2021 ở Đông Nam Á có 90 triệu người mắc đái tháo đường và có 747.000 ca tử vong, trong đó khoảng 90% là bệnh đái tháo đường tuýp 2. Bệnh đái tháo đường xảy ra khi tụy không sản xuất đủ insulin hoặc cơ thể giảm đáp ứng với tác dụng của insulin. Bệnh đái tháo đường được đặc trưng bởi lượng glucose trong máu tăng cao trên mức bình thường kèm các biểu hiện bên ngoài như ăn nhiều, uống nhiều, tiểu nhiều, gầy nhanh [1]. Acarbose là chất ức chế enzym α -glucosidase được sử dụng rộng rãi để điều trị bệnh đái tháo đường tuýp 2 và tiền đái tháo đường ở một số quốc gia. Enzym α -glucosidase trong cơ thể khi gặp các chất có liên kết α -D-glucose sẽ cắt đứt các kết nối này và giải phóng đường D-glucose. Việc này dẫn đến hệ quả làm tăng glucose sau khi ăn và làm gia tăng hàm lượng glucose trong máu. Acarbose làm ức chế enzym α -glucosidase làm chậm quá trình tiêu hóa carbohydrat trong thức ăn và

làm chậm quá trình hấp thụ glucose dẫn đến việc mức tăng đường huyết sau ăn được thu hẹp. Theo y học cổ truyền các loại dược liệu đã và đang được sử dụng như một phương pháp hỗ trợ tăng cường sức khỏe, cải thiện các bệnh liên quan đến đường huyết, lipid huyết... Ở các nước Ấn Độ, Nhật Bản, Trung Quốc, Thái Lan, và Việt Nam, các loại dược liệu như lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh đã được biết đến từ rất lâu và được sử dụng rộng rãi dưới các dạng như dược liệu khô, cao đặc, trà dược liệu hay các chế phẩm viên nén, viên nang...[2], [3], [4], [5]. Đã có nhiều nghiên cứu khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase sử dụng acarbose làm chứng dương trên đĩa 96 giếng cho kết quả IC_{50} khác nhau như đối với mangiferin là 11,9285 μ g/mL [6], đối với cao hạt Xoài là 50,9 μ g/mL [7], đối với quả cây Đung Đính là 123,5 μ g/mL [2]. Tỷ lệ của IC_{50} của cao chiết lá Xoài, mangiferin, Giảo cổ lam, Dây thìa canh đối với acarbose lần lượt là 0,77; 0,04; 0,79; 1,26 [8], [9], [10]. Với mong muốn có thể thực hiện khảo sát đánh giá hoạt tính ức chế men α -glucosidase của các mẫu cao dược liệu nghiên cứu bằng việc sử dụng thiết bị phổ biến tại các phòng thí nghiệm, quy trình “Đánh giá hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết dược liệu sử dụng máy quang phổ hai chùm tia” đã được nghiên cứu xây dựng với mục tiêu: Xây dựng được quy trình đánh giá hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 400nm sử dụng máy đo quang phổ hai chùm tia UV-VIS đồng thời ứng dụng khảo sát hoạt tính ức chế của một số cao chiết từ ba loại dược liệu lá Xoài, Giảo cổ lam và Dây thìa canh.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

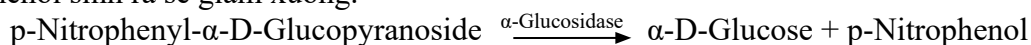
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu: Cao đặc lá Xoài, cao đặc Giảo cổ lam, cao đặc Dây thìa canh (cô đặc từ dịch chiết ethanol 50%), p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (Thụy sĩ), Acarbose (Bayer, Đức), p-nitrophenol (Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, độ tinh khiết 98%), α -glucosidase, natri bicacbonat (Trung Quốc), nước cất (Việt Nam).

Thiết bị: Tủ sấy Memmert, cân đo độ ẩm MX50 AND, máy quang phổ UV-VIS V-730 (Kern - Đức), cân phân tích Kern AES độ chính xác 0,1mg, máy đo pH IKA (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chất p-nitrophenyl- α -D-glucosidase là chất có chứa liên kết α -D-glucosidase vì vậy sẽ bị enzym α -glucosidase cắt đứt liên kết khi có mặt trong phản ứng. p-nitrophenol là sản phẩm sinh ra sau khi enzym α -glucosidase thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucosidase. Lượng p-nitrophenol sinh ra tỉ lệ với lượng α -glucosidase “tham gia” trong quá trình phản ứng. Vì vậy, khi có mặt của chất ức chế men α -glucosidase thì lượng p-nitrophenol sinh ra sẽ giảm xuống.



Sản phẩm sinh ra sau phản ứng có màu vàng nhạt của p-nitrophenol được đo quang trên máy quang phổ hai chùm tia UV-VIS. p-nitrophenol được hấp thụ ở bước sóng 400-405nm. Đo độ hấp thụ của các mẫu thử, mẫu đối chứng xác định được IC_{50} .

- Chuẩn bị dung dịch phản ứng:

+ Chuẩn bị dung dịch acarbose: Nghiền mịn 2 viên thuốc Glucobay (mỗi viên chứa 50mg acarbose), cân chính xác khối lượng tương đương với 50mg hoạt chất cho vào bình định mức 50mL, lắc đều với dung môi hòa tan là đệm pH 6,8, siêu âm trong 15 phút, lọc qua giấy lọc để được nồng độ 1mg/mL (1.000 μ g/mL). dung dịch gốc được pha loãng để

được các nồng độ 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL.

+ Chuẩn bị mẫu thử: Phối hợp 800µL dung dịch acarbose với 800µL đệm 6,8 và 800µL enzym, ủ ở 37°C trong 15 phút; thêm 800µL cơ chất, ủ tiếp ở 37°C; Thêm 3200µL Na₂CO₃ 0,2M vào mẫu để kết thúc phản ứng. Thời gian ủ lần 2 là yếu tố cần khảo sát.

+ Chuẩn bị mẫu đối chứng âm: Mẫu kiểm chứng là mẫu có thành phần giống mẫu thử, thay thế dung dịch thử acarbose bằng đệm pH 6,8.

+ Chuẩn bị mẫu trắng: Mẫu trắng là mẫu có thành phần giống mẫu thử, không được ủ và được phối hợp ngay trước khi đo độ hấp thu.

+ Phần trăm ức chế enzym α-glucosidase được xác định theo công thức:

$$\%I = \frac{A_{DC}-A_T}{A_{DC}} \times 100 (\%).$$

Trong đó: %I (%) phần trăm ức chế của mẫu thử, ADC độ hấp thu của mẫu đối chứng âm, AT là độ hấp thu của mẫu thử.

- **Xây dựng đường chuẩn của p-nitrophenol:** Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Pha dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 10mM trong đệm pH 6,8, pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành dung dịch chuẩn thứ cấp có nồng độ 0,1mM. Pha loãng tiếp dung dịch chuẩn thứ cấp thành các nồng độ 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,0025mM. Đo độ hấp thu ở bước sóng 400nm.

- **Xây dựng quy trình đánh giá hoạt tính ức chế enzym α-glucosidase:**

+ Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzym α-glucosidase: Mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình, sử dụng nồng độ acarbose từ 31,25 đến 500µg/mL để xác định IC₅₀ thông qua phương trình hồi quy, nồng độ của enzym α-glucosidase được khảo sát ở các mức 0,5; 1,0; 2,5 đơn vị/mL, so sánh giá trị độ hấp thu, hệ số tương quan của phương trình hồi quy, IC₅₀ của acarbose, khi áp dụng các mức nồng độ enzym khác nhau.

+ Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng: Mẫu thử và mẫu kiểm chứng được ủ trong 5, 15, 20, 30 phút. Đo độ hấp thu của mẫu ở bước sóng 400nm. So sánh giá trị độ hấp thu của các mẫu với nhau.

+ Khảo sát ảnh hưởng của chất đệm Na₂CO₃: Mẫu kiểm chứng được thêm Na₂CO₃ 0,2M ở các thời điểm 5, 15, 30 phút sau khi ủ lần 2 (lô 1). Đo độ hấp thu của mẫu ở bước sóng 400nm. So sánh giá trị độ hấp thu đối với mẫu được thêm Na₂CO₃ ngay sau khi kết thúc ủ lần 2 (lô 2).

- **Ứng dụng quy trình để xác định IC₅₀ của các cao chiết:**

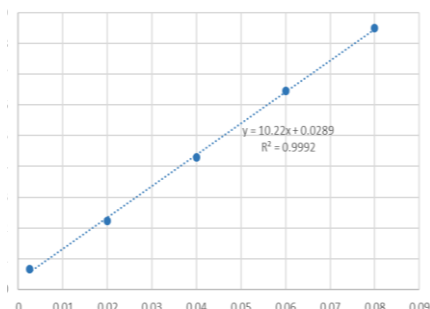
+ Chuẩn bị dung dịch thử: cân chính xác khoảng 100mg cao cho vào bình định mức 10mL, hòa tan và điền đủ bằng DMSO, siêu âm trong 5 phút. Hút 1mL dung dịch cho vào bình định mức 10mL, điền đủ bằng dung dịch đệm pH 6,8 để được nồng độ cao gốc 1.000µg/mL. Dung dịch gốc được pha loãng 2 lần liên tiếp để được các nồng độ 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL.

+ Chuẩn bị dung dịch acarbose: Dung dịch acarbose được chuẩn bị theo quy trình, dung dịch acarbose gốc được điều chỉnh bổ sung DMSO tương đương 10% (tt/tt) để đồng nhất điều kiện phản ứng với các dung dịch cao gốc 1.000µg/mL.

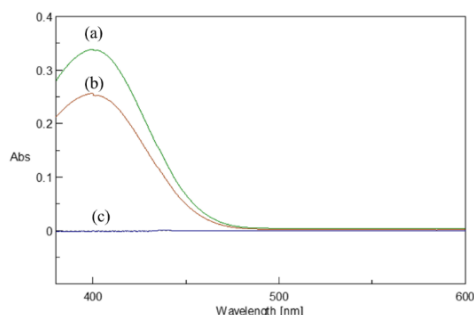
+ Thành phần và điều kiện phản ứng dựa trên kết quả khảo sát quy trình.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng đường chuẩn của p-nitrophenol



Hình 1. Phương trình hồi quy mẫu chuẩn p-nitrophenol

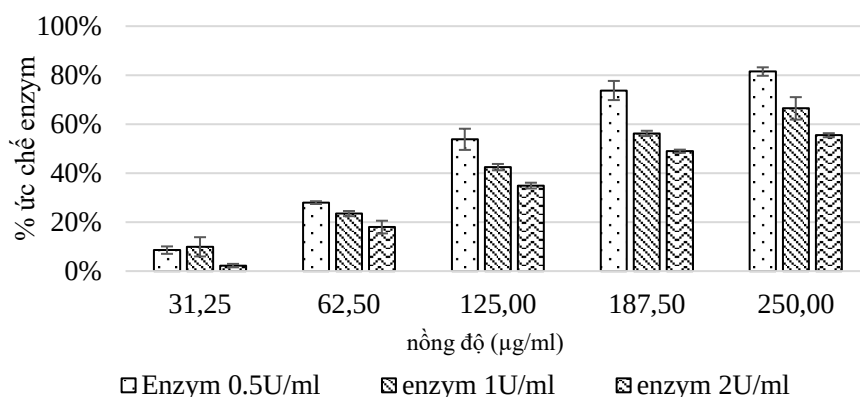


Hình 2. Phổ hấp thụ của mẫu chuẩn (a), mẫu thử (b) và mẫu trắng (c)

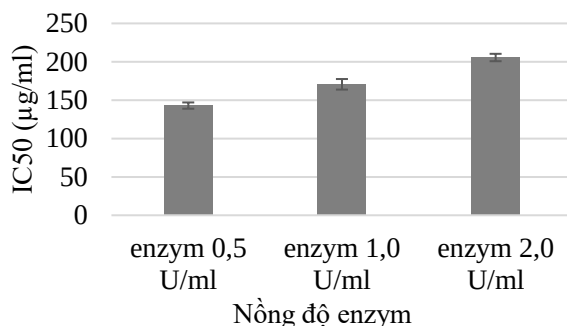
Nhận xét: Phương trình hồi quy từ đường chuẩn: $y = 10,22x + 0,0289$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9992$. Độ hấp thụ tuyến tính với nồng độ p-nitrophenol trong khoảng 0,0025 đến 0,08mM (tương đương với độ hấp thụ trong khoảng 0,0654-0,8503). Mẫu thử và mẫu chuẩn có cực đại hấp thụ ở bước sóng 400nm, mẫu trắng không có cực đại hấp thụ ở bước sóng 400nm chứng tỏ quy trình có tính chọn lọc.

3.2. Xây dựng quy trình đánh giá hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzym α -glucosidase:



Hình 3. Khả năng ức chế enzym của acarbose theo từng nồng độ enzym



Hình 4. IC_{50} của acarbose theo từng nồng độ enzym

Nhận xét: Kết quả sát khả năng ức chế của acarbose khi sử dụng enzym α -glucosidase ở các mức 0,5; 1,0; 2,0 U/mL cho thấy: nồng độ enzym càng tăng, khả năng ức chế enzym của acarbose càng giảm, IC_{50} càng tăng.

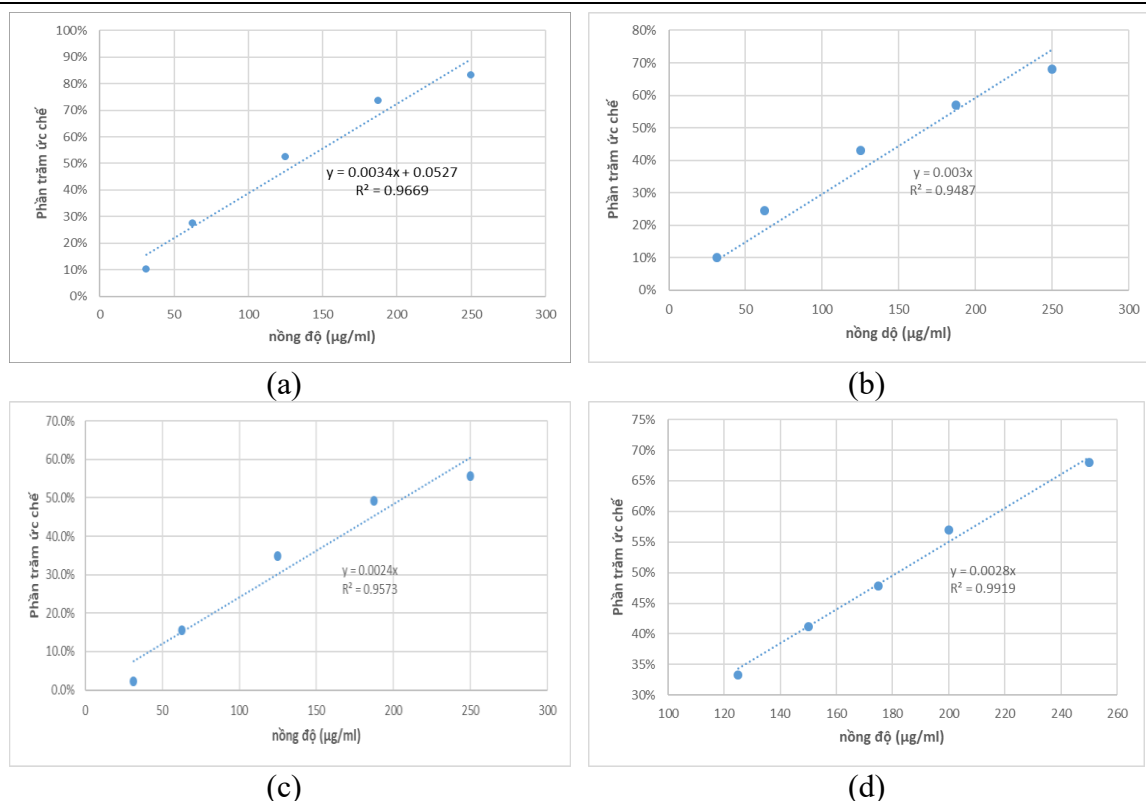
Bảng 1. Giá trị độ hấp thu và khả năng ức chế enzym của acarbose tại các nồng độ enzym khác nhau

Nồng độ enzym 0,5U/mL				Nồng độ enzym 1,0U/mL			
C (μ g/mL)	Abs phản ứng	Abs đối chứng	%I	C (μ g/mL)	Abs phản ứng	Abs đối chứng	%I
250,00	0,0523	0,3051	83%	250,00	0,2231	0,7437	70%
187,50	0,0917	0,3051	70%	187,50	0,3217	0,7437	57%
125,00	0,1517	0,3051	50%	125,00	0,4391	0,7437	41%
62,50	0,2178	0,3051	29%	62,50	0,5763	0,7437	23%
31,25	0,2800	0,3051	8%	31,25	0,6419	0,7437	14%
Nồng độ enzym 2,0U/mL				Nồng độ enzym 1,0U/mL			
C (μ g/mL)	Abs phản ứng	Abs đối chứng	%I	C (μ g/mL)	Abs phản ứng	Abs đối chứng	%I
250,00	0,6326	1,4428	56%	250	0,2313	0,7218	68%
187,50	0,7300	1,4428	49%	200	0,3104	0,7218	57%
125,00	0,9212	1,4428	36%	175	0,3763	0,7218	48%
62,50	0,1450	1,4428	21%	150	0,4241	0,7218	41%
31,25	1,4002	1,4428	3%	125	0,4816	0,7218	33%

Nhận xét: Phân tích giá trị độ hấp thu và khả năng ức chế enzym của acarbose cho thấy: giá trị độ hấp thu của mẫu thử khi khảo sát ở các nồng độ 0,5U/mL và 2,0U/mL nằm ngoài khoảng tuyến tính; độ hấp thu của mẫu thử sử dụng nồng độ enzym 1,0U/mL đều nằm trong khoảng tuyến tính.

Bảng 2. Phương trình hồi quy và IC_{50} của acarbose tại các nồng độ enzym khác nhau

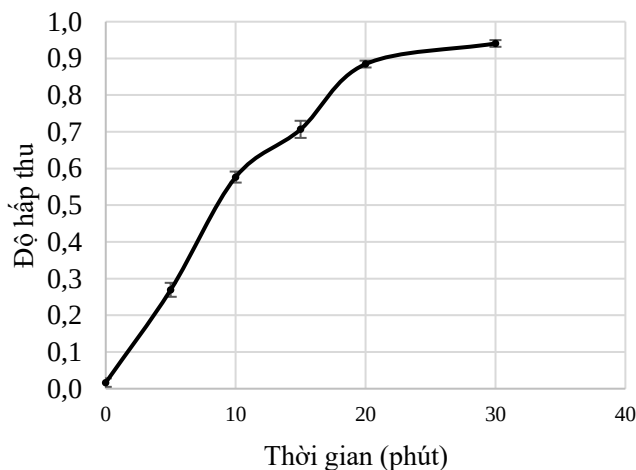
Nồng độ enzym (U/mL)	Khoảng khảo sát (μ g/mL)	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan R^2	IC_{50} (μ g/mL)
0,5	31,25-250,00	$y = 0,0036x$ $y = 0,0034x + 0,0527$ $y = 0,0035x + 0,0527$	0,9644 0,9669 0,9170	142,93 $\pm$ 4,09
1,0	31,25-250	$y = 0,0030x$ $y = 0,0030x$ $y = 0,0028x$	0,9689 0,9487 0,9091	170,63 $\pm$ 6,87
1,0	125-250	$y = 0,0029x$ $y = 0,0028x$ $y = 0,0028x$	0,9977 0,9919 0,9944	176,52 $\pm$ 3,56
2,0	31,25-250	$y = 0,0025x$ $y = 0,0024x$ $y = 0,0024x$	0,9367 0,9573 0,9489	205,56 $\pm$ 4,81



Hình 5. Khả năng ức chế enzym của acarbose
(a) 0,5U/mL; (b) 1,0U/mL; (c) 1,5U/mL; (d) 2,0U/mL

Nhận xét: Phân tích phương trình hồi quy thể hiện sự phụ thuộc giữa nồng độ acarbose và phần trăm ức chế cho thấy: ở khoảng khảo sát từ 31,25-250μg/mL, hệ số tương quan có giá trị từ 0,9091-0,9689. Đánh giá sự phân bố của các điểm xung quanh giá trị ức chế 50% enzym, thu hẹp khoảng khảo sát nồng độ acarbose (sử dụng nồng độ enzym 1,0U/mL). Ở khoảng khảo sát hẹp hơn, giá trị của hệ số tương quan đều lớn hơn 0,99.

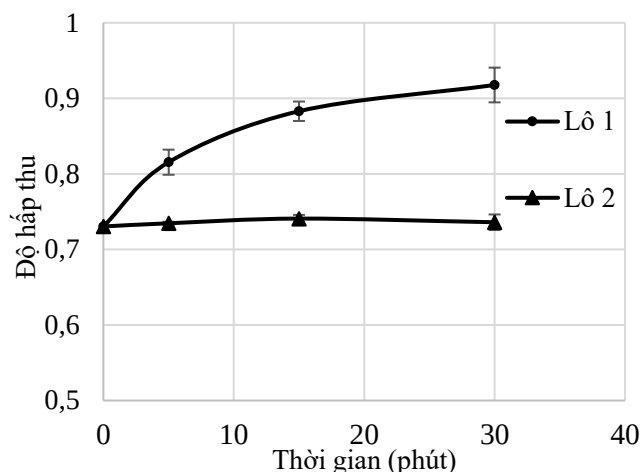
- Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng:



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình phản ứng

Nhận xét: Cố định điều kiện nồng độ enzym 1,0U/mL, kết quả khảo sát thời gian phản ứng cho thấy: tốc độ phản ứng tăng nhanh trong 15 phút đầu, kể từ thời điểm 15 phút, phản ứng chậm lại và không tăng đáng kể. Ở thời điểm 20 phút, giá trị độ hấp thu nằm gần giá trị lớn nhất của khoảng tuyến tính. Ở thời điểm 30 phút, giá trị độ hấp thu nằm ngoài khoảng tuyến tính.

- Khảo sát ảnh hưởng của chất đệm Na_2CO_3 :



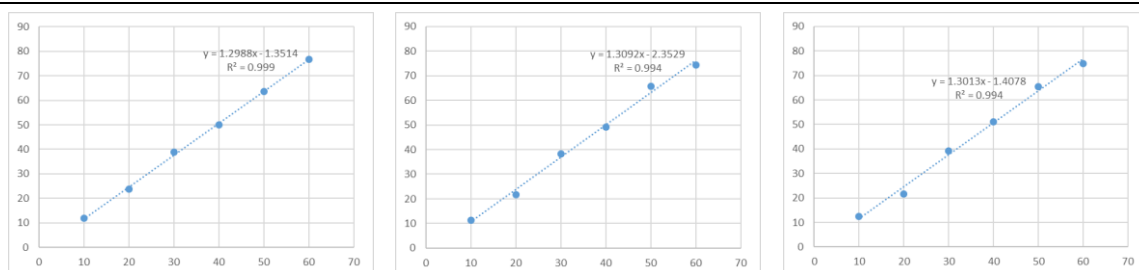
Hình 7. Ảnh hưởng của Na_2CO_3 đến quá trình phản ứng

Nhận xét: Sử dụng điều kiện nồng độ enzym 1,0 U/mL, thời gian ủ 15 phút, kết quả khảo sát ảnh hưởng của Na_2CO_3 cho thấy: lô 1 cho giá trị độ hấp thu tăng dần theo thời gian, sau 15 đến 30 phút, giá trị độ hấp thu của mẫu thử nằm ngoài khoảng tuyến tính. Lô 2 có giá trị độ hấp thu không thay đổi trong suốt quá trình khảo sát.

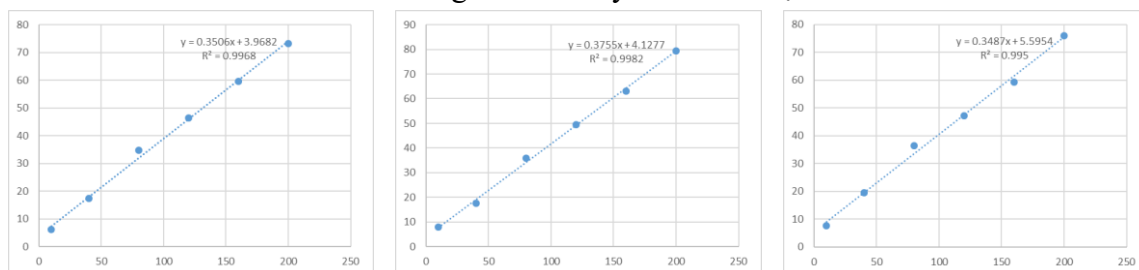
3.3. Ứng dụng quy trình để xác định IC_{50} của các cao chiết

Sau khi khảo sát, quy trình đánh giá hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được xây dựng như sau: Phối hợp 800 μL dung dịch thử với 800 μL dung dịch đệm và 800 μL enzym α -glucosidase (1,0U/mL), ủ ở 37°C trong 15 phút; thêm 800 μL cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucosidase, ủ tiếp ở 37°C trong 15 phút; Thêm 3200 μL Na_2CO_3 0,2M vào mẫu để kết thúc phản ứng. Mẫu thử sau phản ứng được đo độ hấp thu ở bước sóng 400nm. Mẫu đối chứng dương acarbose được thêm DMSO tương đương 10% (tt/tt) vào dung dịch acarbose gốc (1000 $\mu\text{g/mL}$) để tạo điều kiện tương đồng với mẫu cao thử.

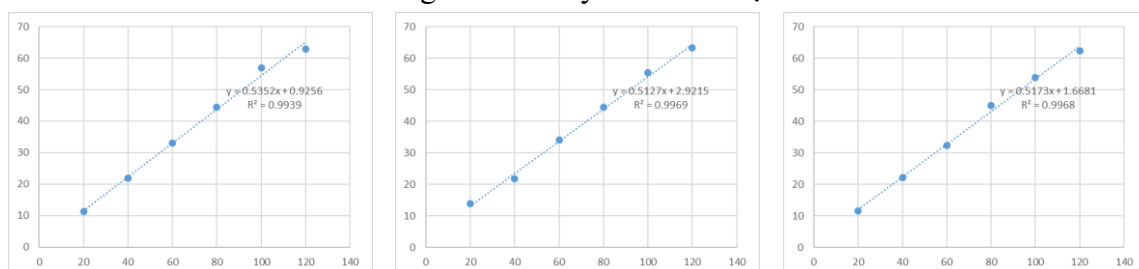
Khoảng nồng độ 31,25-1000 $\mu\text{g/mL}$ ở các mẫu thử đều chứa giá trị IC_{50} nhưng phương trình hồi quy cho hệ số tương quan thấp. Thực hiện điều chỉnh khoảng nồng độ khảo sát của từng cao chiết cho phù hợp cho từng mẫu thử để đạt được hệ số tương quan trên 0,99 (Hình 8, 9, 10). Kết quả IC_{50} của acarbose là 176,09 $\pm$ 0,26 $\mu\text{g/mL}$, cao đặc lá Xoài là 39,68 $\pm$ 0,27 $\mu\text{g/mL}$ (bằng 0,23 $\pm$ 0,01 lần so với acarbose), IC_{50} của cao đặc Giảo cổ lam là 126,94 $\pm$ 4,58 $\mu\text{g/mL}$ (0,72 $\pm$ 0,03 lần so với acarbose), IC_{50} của cao đặc Dây thìa canh là 92,32 $\pm$ 0,97 $\mu\text{g/mL}$ (0,52 $\pm$ 0,01 lần so với acarbose) (Hình 11). IC_{50} của mẫu đối chứng acarbose khi thêm DMSO có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với IC_{50} của mẫu đối chứng acarbose không có mặt DMSO ($p=0,85$).



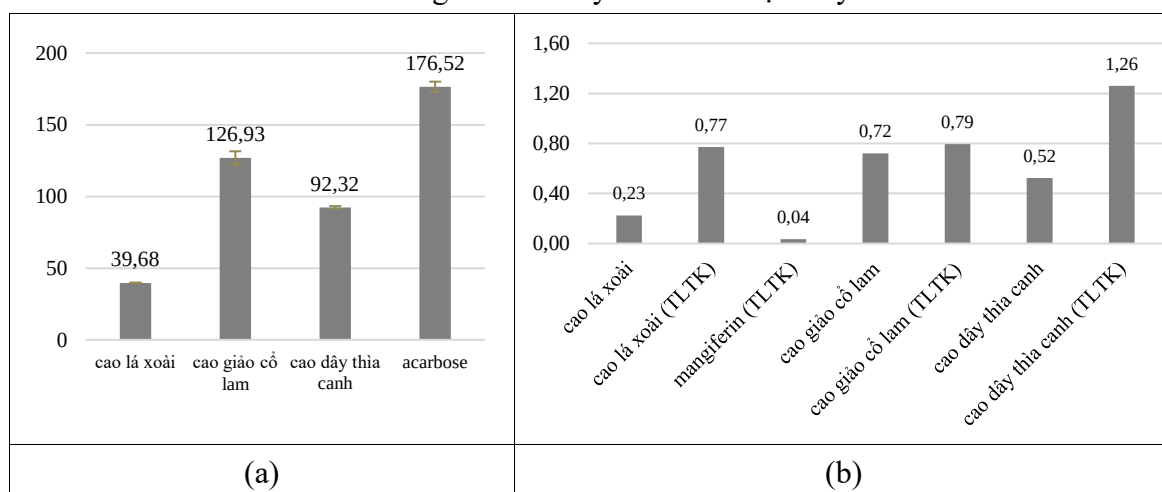
Hình 8. Khả năng ức chế enzyme của cao đặc lá Xoài



Hình 9. Khả năng ức chế enzyme của cao đặc Giảo cổ lam



Hình 10. Khả năng ức chế enzyme của cao đặc Dây thìa canh



Hình 11. Biểu đồ thể hiện IC_{50} của các cao chiết (a) và tỷ lệ IC_{50} của cao chiết so với IC_{50} của chất đối chứng acarbose (b)

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp xác định khả năng ức chế enzyme α -glucosidase dựa trên định lượng gián tiếp p-nitrophenol tạo thành khi chất xúc tác là enzyme bị ức chế một phần. Các công

bỏ trên thế giới lựa chọn bước sóng 400-405nm để định lượng, tùy vào điều kiện hóa chất và thiết bị [2], [6], [7]. Thông qua thực nghiệm, cực đại hấp thụ của p-nitrophenol chuẩn và p-nitrophenol tạo ra trong quá trình phản ứng đều nằm ở bước sóng 400nm, vì vậy chọn bước sóng 400nm để định lượng. Nồng độ p-nitrophenol tuyến tính trong khoảng 0,025-0,08mM, tương đương giá trị độ hấp thụ từ 0,0654-0,8503 là cơ sở để thiết kế các mẫu đo sao cho độ hấp thụ nằm trong khoảng độ hấp thụ của các nồng độ của khoảng tuyến tính.

Về mặt ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến quá trình phản ứng: Nồng độ enzyme ảnh hưởng lớn đến quá trình phản ứng, nồng độ enzyme được sử dụng phổ biến trong thiết kế thí nghiệm nằm trong khoảng 0,2-0,6 [2], [6], [7]. Lượng enzyme tham gia càng nhiều thì IC_{50} của acarbose càng tăng vì phải tăng lượng hoạt chất để có thể ức chế lượng lớn enzyme. Tùy vào nguồn hóa chất, cấu tạo thiết bị và tỷ lệ thành phần tham gia phản ứng mà nồng độ enzyme ít hay nhiều. Kết quả thực nghiệm cho thấy, nồng độ enzyme 2,0U/mL cho $\pm 4,81\mu\text{g/mL}$ khi áp dụng điều kiện này. Ở nồng độ enzyme 0,5 và 1,0U/mL đều cho giá trị độ hấp thụ nằm trong khoảng tuyến tính, các mẫu sử dụng enzyme 1,0 cho giá trị độ hấp thụ nằm giữa khoảng tuyến tính, các mẫu sử dụng enzyme 0,5U/mL nằm lệch về phía giá trị độ hấp thụ thấp hơn của đường tuyến tính. Lựa chọn nồng độ enzyme 1,0U/mL là phù hợp hơn, cho phép xác định IC_{50} dễ dàng hơn khi ứng dụng trên các mẫu cao dược liệu vì khoảng cách độ hấp thụ rộng và nằm giữa đường chuẩn p-nitrophenol. Khi điều chỉnh thu hẹp nồng độ acarbose từ 125-250 $\mu\text{g/mL}$ thì cải thiện rõ giá trị của hệ số tương quan (đạt trên 0,99) và khả năng lặp lại cao hơn. Về mặt ảnh hưởng của thời gian phản ứng và tác nhân kết thúc phản ứng Na_2CO_3 : Ở nhiệt độ cố định, thời gian phản ứng càng dài thì lượng p-nitrophenol sinh ra càng lớn. Nếu p-nitrophenol sinh ra quá nhiều thì có nguy cơ vượt ngoài khoảng tuyến tính và vượt quá khả năng ghi nhận của thiết bị. Nếu p-nitrophenol sinh ra ít thì có khả năng đạt độ nhạy của thiết bị và giá trị không có độ tin cậy cao. Thiết kế nghiên cứu lựa chọn độ hấp thụ của mẫu đối chứng âm theo thời gian (mẫu không có chất ức chế enzyme) làm cơ sở để lựa chọn thời gian phản ứng phù hợp. Độ hấp thụ của mẫu đối chứng âm tăng dần trong suốt thời gian khảo sát từ 0-30 phút. Ở thời điểm 20 phút, độ hấp thụ của mẫu đo có giá trị gần với cận trên của đường tuyến tính. Ở thời điểm 30 phút, giá trị độ hấp thụ nằm ngoài đường tuyến tính. Thời điểm 15 phút là phù hợp nhất để diễn ra phản ứng, giá trị này nằm không quá gần cận trên của đường tuyến tính, thời gian không quá dài để tiến hành thực hiện. Độ hấp thụ tăng dần trong quá trình quan sát và không có điểm bão hòa cho thấy hiệu suất phản ứng không đạt 100%. Vấn đề hiệu suất trong khảo sát này có thể bỏ qua, vì giá trị của hệ số tương quan trên 0,99 và khả năng lặp lại của phản ứng khi thực hiện 3 lần riêng biệt. Các phản ứng invitro đều được thực hiện với cùng một chất đối chứng, và so sánh với IC_{50} của chất đối chứng cùng điều kiện. Do đó phản ứng không nhất thiết phải diễn ra hoàn toàn, chỉ cần đảm bảo kết quả lặp lại trong quá trình thực nghiệm. Na_2CO_3 tham gia để kết thúc phản ứng, đảm bảo các mẫu thử đều dừng lại ở cùng 1 thời điểm, nhằm đảm bảo độ chính xác và lặp lại của kết quả đo. Hỗn hợp phản ứng được lấy ra môi trường nhiệt độ phòng sau khi ủ vẫn còn phản ứng tiếp trong khoảng 15 phút vì lượng nhiệt còn lại trong dụng cụ chứa. Do đó cần kết thúc phản ứng ngay khi ngưng ủ bằng Na_2CO_3 để đảm bảo tính chính xác của cả quá trình.

Về khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao đặc lá xoài, cao đặc giáo cỏ lam và cao đặc dây thìa canh: Tỷ lệ giữa IC_{50} của cao và thuốc đối chứng càng thấp thì hiệu quả ức chế enzyme càng cao. Khả năng ức chế enzyme giảm dần từ cao đặc lá Xoài, cao đặc Giáo cỏ lam, cao đặc Dây thìa canh và acarbose. Khả năng ức chế enzyme của các loại cao

chiết cao hơn so với một số nghiên cứu trên thế giới, khả năng ức chế của cao lá xoài thấp hơn so với mangiferin tinh khiết [3], [6]. Sự khác biệt này có thể giải thích là do điều kiện thổ nhưỡng khác nhau kết hợp với điều kiện chiết và tinh chế làm giàu các hợp chất có hoạt tính trong cao chiết được liệu.

V. KẾT LUẬN.

Kết quả thử nghiệm đánh giá *in vitro* trên máy quang phổ hai chùm tia UV-VIS đo ở bước sóng 400nm của cao đặc các loại dược liệu lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh có tác dụng ức chế men α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là $39,68 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$, $126,94 \pm 4,58 \mu\text{g/mL}$, $92,32 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$, so với giá trị IC_{50} của acarbose là $176,09 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu này cho thấy các cao đặc dược liệu từ lá Xoài, Giảo cổ lam, Dây thìa canh có khả năng ức chế tốt men α -glucosidase góp phần trong việc phòng và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường, mặt khác có thể sử dụng máy quang phổ hai chùm tia UV-VIS thông thường trong nghiên cứu *in vitro* ở cao đặc dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Quyết định số 5481/QĐ-BYT ngày 30/12/2020: Về việc ban hành tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị đái tháo đường týp 2. 2020.
2. Lê Trọng Đức, Nguyễn Nguyễn Cường Phát, Huỳnh Tiến Sỹ. Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol từ lá và quả cây Đứng đỉnh (*Caryota mitis* L.). Đánh giá khả năng điều hòa glucose thông qua hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. *Tạp chí khoa học trường đại học sư phạm thành phố Hồ Chí Minh*. 2019. 16(12), 961-974, <https://doi.org/10.54607/hcmue.js.16.12.2559>(2019).
3. Santos C. M. M., Proença C., Freitas M., Araújo A. N., Silva A. M. S., et al. Inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by hydroxylated xanthenes. *Food Funct*. 2022. 13(14), 7930-7941, <https://doi.org/10.1039/d2fo00023g>.
4. Trinh B. T. D., Staerk D., Jäger A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2016. 186, 189-195, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.060>.
5. Somtimuang C., Olatunji O. J., Ovatlarnporn C.. Evaluation of *In Vitro* α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Potentials of 14 Medicinal Plants Constituted in Thai Folk Antidiabetic Formularies. *Chem Biodivers*. 2018. 15(4), e1800025. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800025>.
6. Ganogpichayagrai A., Palanuvej C., Ruangrunsi N. Antidiabetic and anticancer activities of *Mangifera indica* cv. Okrong leaves. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2017. 8, 19-24, <https://doi.org/10.4103/2231-4040.197371>.
7. Yang D., Chen X., Liu X., Han N., Liu Z., et al. Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities Guided Isolation and Identification of Components from Mango Seed Kernel. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. 2020, 1-15, <https://doi.org/10.1155/2020/8858578>.
8. Ranjan A., Singh R. K., Khare S., Tripathi R., Pandey R. K., et al. Characterization and evaluation of mycosterol secreted from endophytic strain of *Gymnema sylvestre* for inhibition of α -glucosidase activity. *Scientific Reports*. 2019. 9, 17303, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53227-w>.
9. Megalli S., Davies N. M., Roufogalis B. D. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2006. 9, 281-29, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17207412/>.
10. Kulkarni V. M., Rathod, V. K. Exploring the potential of *Mangifera indica* leaves extract versus mangiferin for therapeutic application, *Agriculture and Natural Resources*. 2018. 52(2), 155-161, <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.07.001>.