

# SO SÁNH HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME ALPHA-AMYLASE VÀ BẮT GỐC TỰ DO DPPH CỦA MỘT SỐ DƯỢC LIỆU

Võ Thanh Sang<sup>(1)</sup>, Trần Minh Khánh<sup>(1)</sup>, Ngô Đại Hùng<sup>(2)</sup>

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

Ngày nhận bài 27/5/2024; Chấp nhận đăng 15/8/2024

Liên hệ email: hungnd@tdmu.edu.vn

## Tóm tắt

Việt Nam có nhiều nguồn dược liệu có thể được sử dụng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường. Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế enzyme thủy phân tinh bột  $\alpha$ -amylase và khả năng bắt gốc tự do của một số dược liệu như lá ổi (*Psidium guajava*), lá xoài (*Mangifera indica*), tầm bóp (*Physalis angulata*), lá dứa (*Pandanus amaryllifolia*), lá sung (*Ficus glomerata*), lá sake (*Artocarpus altilis*), và bạc đầu (*Gomphrena celosioides*) đã được so sánh để xác định nguồn dược liệu phù hợp cho việc ứng dụng trong hỗ trợ điều trị đái tháo đường loại 2. Kết quả khảo sát cho thấy rằng các cao chiết ethanol của các dược liệu trên có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase tại giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 136,8; 184,7; 228,3; 159,1; 264,5; 152,4; và 204,4  $\mu$ g/ml. Hơn nữa, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) của các dược liệu trên cũng được xác định tại nồng độ 100  $\mu$ g/ml lần lượt là 58,5%; 47,8%; 38,6%; 38,2%; 39,4%; 51,1%; và 33,7%. Như vậy, cao chiết lá ổi có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH cao nhất, tạo cơ sở cho việc ứng dụng lá ổi trong hỗ trợ phòng ngừa và chữa trị đái tháo đường loại 2.

**Từ khóa:** đái tháo đường, enzyme alpha-amylase, lá ổi, lá sake, lá xoài

## Abstract

### COMPARISON OF ALPHA-AMYLASE ENZYME INHIBITION AND DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES OF SOME MEDICINAL PLANTS

Numerous medicinal plants in Vietnam have been used as a remedy for the prevention and treatment of diabetes. In this study, the inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase enzyme and the free radical scavenging capacity of some medicinal herbs such as *Psidium guajava* leaves, *Mangifera indica* leaves, *Physalis angulata*, *Pandanus amaryllifolia* leaves, *Ficus glomerata* leaves, *Artocarpus altilis* leaves, and *Gomphrena celosioides* were compared to identify suitable medicinal sources for application in the treatment of type 2 diabetes. The results showed that the ethanol extracts of the above medicinal herbs exhibited  $\alpha$ -amylase inhibitory activity with  $IC_{50}$  values of 136.8; 184.7; 228.3; 159.1; 264.5; 152.4; and 204.4  $\mu$ g/ml, respectively. Furthermore, it was determined that the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity of these medicinal herbs at a concentration of 100  $\mu$ g/ml was 58.5%; 47.8%; 38.6%; 38.2%; 39.4%; 51.1%; and 33.7%, respectively. Thus, the *Psidium guajava* leaf extract showed the highest  $\alpha$ -amylase inhibitory activity and DPPH free radical scavenging activity, providing a basis for the application of guava leaves in the prevention and treatment of type 2 diabetes.

## 1. Giới thiệu

Đái tháo đường là một trong những bệnh phổ biến nhất trên thế giới. Theo dự đoán của Tổ chức Y tế Thế giới, đến năm 2025 sẽ có khoảng 300 triệu người mắc bệnh tiểu đường (Hung và nnk., 2012). Bệnh liên quan đến rối loạn chuyển hóa do lối sống và có tỷ lệ mắc bệnh ngày càng tăng. Bệnh được mô tả bởi sự thiếu hụt tương đối hoặc tuyệt đối của insulin và/hoặc hoạt động của insulin gây ra tình trạng không dung nạp glucose và làm suy yếu quá trình chuyển hóa lipid, carbohydrate và protein (Guillausseau và nnk., 2008). Bệnh nhân đái tháo đường lâu dài có thể dẫn đến các biến chứng như

bệnh võng mạc, bệnh thận, tim mạch và bệnh lý thần kinh ngoại biên (White, 2015). Hiện nay, các thuốc điều trị đái tháo đường như sulfonylurea, biguanides, thuốc ức chế  $\alpha$ -glucosidase, thiazolidinediones và thuốc ức chế dipeptidyl peptidase-4 là những liệu pháp chính cho bệnh nhân đái tháo đường loại 2 (Chaudhury và nnk., 2017). Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn như tiêu chảy, suy thận, suy gan. Vì vậy, nghiên cứu các liệu pháp kháng đái tháo đường an toàn và hiệu quả hơn từ nguồn thiên nhiên mang tính cấp thiết.

Cho đến nay, các liệu pháp có nguồn gốc từ dược liệu vẫn là xu hướng phổ biến trong chăm sóc sức khỏe vì an toàn hơn khi sử dụng (Galabuzi và nnk., 2010). Trong đó, nhiều thảo dược được biết đến với vai trò quan trọng trong phòng ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường loại 2 thông qua ức chế enzyme thủy phân tinh bột như  $\alpha$ -amylase, làm hạ đường huyết, làm khỏe tuyến tụy giúp tăng sản sinh insulin, chống oxy hóa (Jung và nnk., 2006). Ở Việt Nam, một số thảo dược đã được thông tin về khả năng ổn định đường huyết cho bệnh nhân đái tháo đường loại 2 như lá ổi, lá xoài, tầm bóp, lá dứa, lá sung, lá sake, bạc đầu. Hoạt tính ổn định đường huyết của chúng có thể một phần liên quan đến khả năng ức chế enzyme thủy phân tinh bột như  $\alpha$ -amylase (Kashtoh và nnk., 2023). Trong nghiên cứu này, mức độ hiệu quả trong hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase của các dược liệu trên được so sánh để xác định nguồn dược liệu tiềm năng nhất, từ đó định hướng sử dụng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Các dược liệu gồm lá ổi (*Psidium guajava*), lá xoài (*Mangifera indica*), tầm bóp (*Physalis angulata*), lá dứa (*Pandanus amaryllifolia*), lá sung (*Ficus glomerata*), lá sake (*Artocarpus altilis*), bạc đầu (*Gomphrena celosioides*) được thu nhận ở Tây Ninh. Ethanol sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ Xilong, Trung Quốc. Các hóa chất khác như dinitrosalicylic acid (DNS), enzyme  $\alpha$ -amylase, DPPH (2,2-Diphenyl-1 picrylhydrazyl) được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich, Mỹ.

### 2.2. Phương pháp tách chiết

Các dược liệu được rửa sạch, sấy khô 60°C trong 5 ngày và xay thành bột bằng máy xay sinh tố. Bột mẫu có độ ẩm dưới 10% được ngâm trong ethanol theo tỷ lệ 1g bột khô/8ml ethanol 96%, kéo dài trong 4 giờ ở nhiệt độ 60°C. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần và dịch chiết được thu chung thành dung dịch chiết tổng. Dịch chiết tổng sau đó được cô quay ở nhiệt độ 40°C để đuổi dung môi và thu nhận cao chiết sệt. Cao chiết sau đó được sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C để thu nhận cao ethanol tổng có độ ẩm dưới 12%. Cao tổng được lưu giữ trong ngăn mát tủ lạnh nhiệt độ 4°C cho đến khi được sử dụng. Cao tổng được pha trong ethanol để đạt được mẫu thử có nồng độ thích hợp.

### 2.3. Phương pháp khảo sát hoạt tính ức chế enzyme $\alpha$ -amylase

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase được thực hiện như mô tả bởi Bhutkar và Bhise (2012). Đầu tiên, lấy 1ml dịch cao chiết (50, 100 hoặc 200 $\mu$ g/ml) ủ trước với 1ml  $\alpha$ -amylase (Sigma-Aldrich A4582, pha loãng đến 10000 trong đệm sodium phosphate 20mM, pH 6,9) trong 30 phút, sau đó thêm 1ml dung dịch tinh bột (1% w/v). Hỗn hợp được ủ tiếp ở 37°C trong 10 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 1ml thuốc thử DNS và sau đó hỗn hợp được đun sôi trong 5 phút. Mẫu đối chứng (C) không có dịch chiết mẫu và mẫu trắng (B) không có enzyme  $\alpha$ -amylase. Độ hấp thụ sản phẩm phản ứng được đo ở bước sóng 540nm bằng máy microplate reader (BioTek Instruments, Mỹ). Tỷ lệ phần trăm ức chế được tính bằng công thức sau:

$$\text{Phần trăm ức chế (\%)} = [(OD_C - OD_B) - (OD_{\text{mẫu}} - OD_B)] / (OD_C - OD_B) \times 100\%$$

### 2.4. Khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Lấy 100 $\mu$ l cao chiết mẫu ở nồng độ 100 $\mu$ g/ml cho vào ống phản ứng, sau đó cho thêm 100 $\mu$ l dung dịch DPPH tại nồng độ 0,3mM. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Mật độ quang của hỗn hợp được đo ở bước sóng 490nm, và khả năng bắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức sau:

$$\text{Khả năng bắt gốc tự do DPPH (\%)} = [(OD_{\text{chứng âm}} - OD_{\text{mẫu}}) / OD_{\text{chứng âm}}] \times 100$$

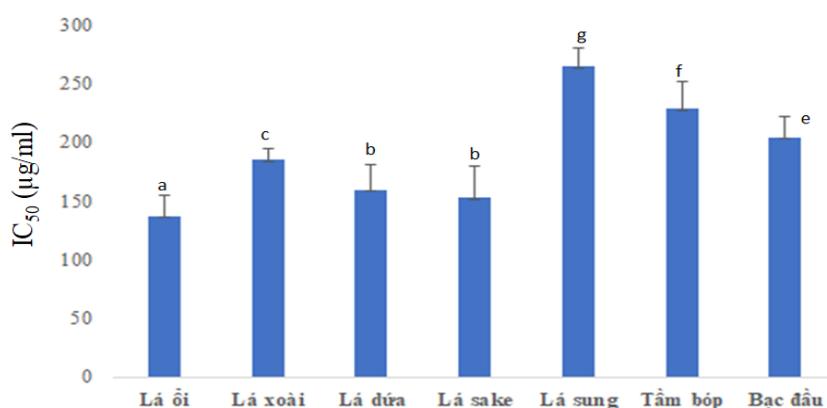
### 2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS. Sự khác nhau giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ . Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Các trị số trung bình, sai số, và  $IC_{50}$  (nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzyme của mẫu thử) được xử lý bằng phần mềm Excel 2010.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Hoạt tính ức chế enzyme $\alpha$ -amylase

Tăng đường huyết là đặc điểm chính trong sự phát triển của bệnh đái tháo đường và gây ra nhiều biến chứng khác nhau ở bệnh nhân đái tháo đường. Tăng đường huyết được biết là có liên quan đến hoạt động của enzyme  $\alpha$ -amylase, một enzyme phổ biến trong thủy phân carbohydrate trong hệ tiêu hóa con người (Mahmood, 2016). Do đó, việc làm giảm hoạt động của enzyme  $\alpha$ -amylase được xem là một liệu pháp hiệu quả trong ngăn chặn hoặc làm chậm quá trình hấp thụ glucose sau bữa ăn, góp phần kiểm soát tình trạng tăng đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường (Rehman và nnk., 2019). Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase của lá ổi, lá xoài, tầm bóp, lá dứa, lá sake, và bạc đầu được so sánh với nhau để xác định loại dược liệu tiềm năng nhất cho định hướng sử dụng trong phòng và hỗ trợ làm giảm đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường. Kết quả thể hiện hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase của các loại dược liệu được thể hiện ở hình 1. Kết quả khảo sát cho thấy có sự phân hóa mạnh yếu về hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase giữa các dược liệu. Trong đó, cao chiết lá ổi thể hiện hoạt tính ức chế  $\alpha$ -amylase mạnh nhất ( $IC_{50}$  136,8 $\mu$ g/ml) cao hơn acarbose ( $IC_{50}$  141 $\mu$ g/ml) (Đỗ Nguyễn Anh Thư và nnk., 2021), tiếp sau lần lượt là lá sake ( $IC_{50}$  152,4 $\mu$ g/ml), lá dứa ( $IC_{50}$  159,1 $\mu$ g/ml), lá xoài ( $IC_{50}$  184,7 $\mu$ g/ml), bạc đầu ( $IC_{50}$  204,4 $\mu$ g/ml), tầm bóp ( $IC_{50}$  228,3 $\mu$ g/ml) và lá sung ( $IC_{50}$  264,5 $\mu$ g/ml). Những dược liệu có giá trị  $IC_{50}$  thấp hơn 200 $\mu$ g/ml, gồm lá ổi, lá sake, lá dứa, và lá xoài. Như vậy, lá ổi được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho khả năng làm chậm quá trình tiêu hóa, giúp hạn chế tình trạng tăng cao đường huyết sau ăn, góp phần cải thiện bệnh tật và các biến chứng. Tuy nhiên, việc phối hợp lá ổi, lá sake, lá dứa, và lá xoài cùng nhau trong một bài thuốc cũng là một đề xuất có thể được sử dụng trong kiểm soát đường huyết.

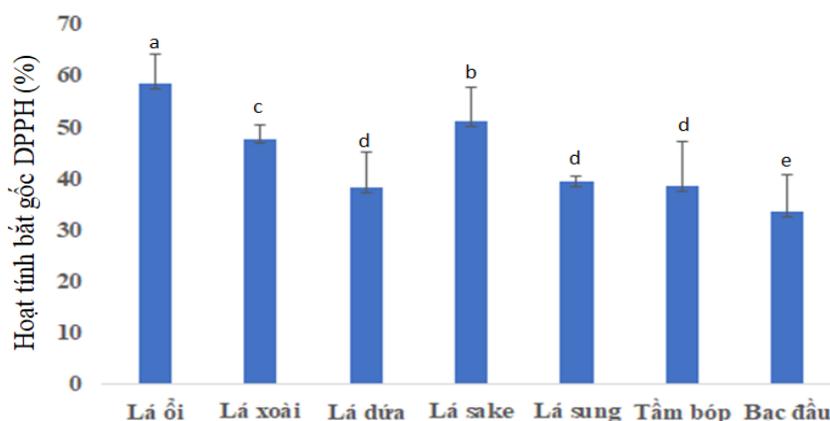


Hình 1. Giá trị  $IC_{50}$  về hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase của các dược liệu

### 3.2. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Stress oxy hóa là sự mất cân bằng giữa việc sản sinh các gốc tự do và khả năng hoạt động của hệ thống chống oxy hóa của cơ thể. Nó có thể gây ra quá trình chết tế bào theo chương trình của tế bào beta tuyến tụy và làm kháng insulin (West, 2000). Hơn nữa, vai trò của stress oxy hóa đã được chứng minh trong cơ chế bệnh sinh và sự phát triển của các biến chứng từ bệnh nhân đái tháo đường bao gồm bệnh võng mạc, bệnh thận, bệnh thần kinh (Niedowicz và nnk., 2005). Trong khi đó, chất chống oxy hóa hoạt động bằng cách loại bỏ các gốc tự do hoặc tăng cường khả năng của

các enzyme phòng thủ chống oxy hóa. Do đó, chất chống oxy hóa sẽ cung cấp một chiến lược điều trị để ngăn ngừa stress oxy hóa và các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường do tác nhân oxy hóa gây ra (Sarita và nnk., 2012). Trong nghiên cứu này, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của các dược liệu trên đã được so sánh để thấy tiềm năng chống oxy hóa của chúng, từ đó đề xuất sử dụng trong công thức hỗ trợ chữa trị đái tháo đường. Kết quả về hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của các dược liệu được thể hiện trong hình 2. Kết quả cho thấy, tại nồng độ 100µg/ml, cao chiết lá ổi có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH cao nhất là 58,5%, tiếp sau lần lượt là các dược liệu gồm lá sake (51,1%), lá xoài (47,8%), lá sung (39,4%), lá dứa (38,2%), tầm bóp (38,6%) và bạc đầu (33,7%). Các cao chiết lá ổi, lá sake và lá xoài có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH tại nồng độ 100µg/ml cao hơn so với cao chiết rau càng cua (46%) (Đỗ Nguyễn Anh Thư và nnk., 2021). Trong đó, các dược liệu có phần trăm bắt gốc tự do trên 50% tại nồng độ 100µg/ml gồm cao chiết lá ổi và lá sake. Với hoạt tính chống oxy hóa vượt trội, lá ổi và lá sake có thể được sử dụng như các nguồn nguyên liệu tiềm năng trong việc thu nhận các gốc tự do, góp phần quan trọng trong việc ngăn chặn các biến chứng do gốc oxy hóa gây nên ở bệnh nhân đái tháo đường.



**Hình 2.** Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của dược liệu tại nồng độ 100µg/ml

Các kết quả trên cho thấy rằng cao chiết lá ổi không chỉ thể hiện khả năng ức chế hoạt tính thủy phân tinh bột của enzyme  $\alpha$ -amylase, mà còn có thể thu dọn các gốc tự do một cách hiệu quả, góp phần nâng cao giá trị của lá ổi trong việc sản xuất các sản phẩm ứng dụng phục vụ nhu cầu hỗ trợ chữa trị đái tháo đường của cộng đồng. Lá ổi đã được biết đến là một nguồn giàu các hợp chất polyphenol với nhiều dược tính khác nhau. Lá ổi đã được xác định có chứa các hợp chất phenolic như quercetin, myricetin, catechin, gallic acid và ellagic acid cùng các dẫn xuất của chúng (Chang và nnk., 2013). Điều này cho thấy rõ ràng là các hợp chất phenolic hoặc đồ uống giàu phenolic có khả năng giảm đường huyết sau ăn và lúc đói ở bệnh nhân đái tháo đường, kích thích tiết insulin và cải thiện độ nhạy insulin (Aryaeian và nnk., 2017). Các cơ chế đã được xác định thông qua giảm hấp thu glucose ở ruột, ức chế tiêu hóa carbohydrate, tăng cường tiết insulin từ các tế bào beta của tuyến tụy, điều chỉnh sự giải phóng glucose từ gan và kích hoạt sự hấp thu glucose ở các mô. Hơn nữa, khả năng chống oxy hóa và chống viêm cao của polyphenol đã góp phần vào hiệu quả phòng ngừa các biến chứng liên quan đến bệnh đái tháo đường như bệnh võng mạc, bệnh thận và bệnh thần kinh (Bahadoran và nnk., 2013). Do đó, lá ổi được xem là một nguồn nguyên liệu tiềm năng trong việc phòng ngừa bệnh đái tháo đường.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu này đã so sánh hiệu quả ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase và khả năng bắt gốc tự do DPPH của một số loại dược liệu, nhằm tìm ra nguồn tiềm năng để hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường. Kết quả cho thấy cao chiết lá ổi có hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase và khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất. Với hoạt tính vượt trội trong việc ức chế quá trình thủy phân carbohydrate và thu dọn các gốc tự do, lá ổi được xác định là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc phát triển các sản phẩm hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

**Lời cảm ơn**

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Trường Đại học Nguyễn Tất Thành trong đề tài có mã số 2021.01.42/HĐ-KHCN.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1] Aryaeian, N., Sedehi, S. K., Arablou, T. (2017). Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. *Med J Islam Repub Iran*, 26(31), 134.
- [2] Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1), 43.
- [3] Bhutkar, M. A., Bhise, S. B. (2012). In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *Int. J. Chem. Sci*, 10, 457-462.
- [4] Chang, C. H., Hsieh, C. L., Wang, H. E., Peng, C. C., Chyau, C. C., Peng, R. Y. (2013). Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. *J. Sci. Food Agric*, 93(4), 944-954.
- [5] Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., Mirza, W. (2017). Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Front Endocrinol*, 8, 6.
- [6] Đỗ Nguyễn Anh Thư, Võ Thanh Sang, Ngô Đại Hùng (2021). Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme thủy phân tinh bột và bắt gốc tự do của cao chiết rau càng cua. *Tạp chí khoa học Đại học Thủ Dầu Một*, 5(54), 35-41.
- [7] Galabuzi, C., Agea, J. G., Fungo, B. L., Kamoga, R. M. N. (2010). Traditional medicine as an alternative form of health care system: a preliminary case study of nangabo sub-county, central uganda. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med*, 7, 11-16.
- [8] Guillausseau, P. J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Médeau, V., Kevorkian, J. P. (2008). Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 34, S43-S48.
- [9] Hung, H. Y., Qian, K., Morris-Natschke, S. L., Hsu, C. S., Lee, K. H. (2012). Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat. Prod. Rep*, 29, 580-606.
- [10] Jung, M., Park, M., Lee, H. C., Kang, Y. H., Kang, E. S., Kim, S. K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr. Med. Chem*, 13, 1203-1218.
- [11] Kashtoh, H., Baek, K. H. (2023). New insights into the latest advancement in  $\alpha$ -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects. *Plants*, 12(16), 2944.
- [12] Mahmood, N. (2016). A review of  $\alpha$ -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comp. Clin. Path*, 25, 1253-1264.
- [13] Niedowicz, D. M., Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys*, 43(2), 289-330.
- [14] Rehman, K., Chohan, T. A., Waheed, I., Gilani, Z., Akash, M. S. H. (2019). Taxifolin prevents postprandial hyperglycemia by regulating the activity of  $\alpha$ -amylase: Evidence from an in vivo and in silico studies. *J. Cell Biochem*, 120, 425-438.
- [15] Sarita, B., Afreen, K. (2012). Antioxidants and diabetes. *Indian J. Endocrinol. Metab*, 16(Suppl 2), S267-S271.
- [16] West, I. C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med*, 17(3), 171-180.
- [17] White, N. H. (2015). Long-term outcomes in youth with diabetes mellitus. *Pediatr. Clin. North. Am*, 62, 889-909.