



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME
 α -amylase và α -glucosidase CỦA MỘT SỐ
CÂY THUỐC DÂN GIÀN ĐIỀU TRỊ BỆNH
ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

Chủ nhiệm đề tài: Ths. Lê Quốc Duy

Chức danh: Giảng viên

Đơn vị: Khoa Nông nghiệp – Thủy sản

Trà Vinh, ngày.....tháng.....năm 2017



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

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

Xác nhận của cơ quan chủ quản

(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài

(Ký, ghi rõ họ tên)

Lê Quốc Duy

Trà Vinh, ngày tháng năm 2017

TÓM TẮT

Đái tháo đường là một căn bệnh mãn tính với nhiều biến chứng nguy hiểm, biểu hiện đặc trưng của bệnh là hiện tượng tăng đường huyết và rối loạn chuyển hóa carbohydrate. Nhằm tìm kiếm và bổ sung nguồn thảo dược đầy tiềm năng và phong phú với khả năng làm hạ đường huyết và chống oxy hóa hiệu quả nên đề tài “**Khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của một số cây thuốc dân gian điều trị bệnh đái tháo đường**” được thực hiện nhằm mục tiêu tuyển chọn các cây dược liệu trị đái tháo đường hiệu quả có nguồn gốc thiên nhiên, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi để người bệnh và thầy thuốc có thêm lựa chọn. Kết quả phân tích định tính cho thấy, cao ethanol từ các mẫu lá chứa các hợp chất như alkaloid, flavonoid, tannin và saponin. Cao ethanol từ các mẫu lá có khả năng ức chế enzyme α -amylase: lá Ổi ($IC_{50} = 42,94 \mu\text{g/mL}$); lá Xoài ($IC_{50} = 61,17 \mu\text{g/mL}$), lá măng cầu Ta ($IC_{50} = 64,85 \mu\text{g/mL}$), lá măng cầu Xiêm ($IC_{50} = 76,36 \mu\text{g/mL}$) và lá Bình bát ($IC_{50} = 88,93 \mu\text{g/mL}$). Đồng thời, cao ethanol từ các mẫu lá cũng ức chế hoạt tính của enzyme α -glucosidase: lá bình bát ($IC_{50} = 18,18 \mu\text{g/mL}$), lá xoài ($IC_{50} = 33,18 \mu\text{g/mL}$), lá măng cầu xiêm ($IC_{50} = 45,49 \mu\text{g/mL}$), lá măng cầu ta ($IC_{50} = 55,74 \mu\text{g/mL}$) và lá ổi ($IC_{50} = 97,47 \mu\text{g/mL}$). Phân tích hiệu quả khử gốc tự do cho thấy, cao ethanol từ các mẫu lá có khả năng khử gốc tự do DPPH: lá bình bát ($IC_{50} = 285,81 \mu\text{g/mL}$), lá măng cầu Ta ($IC_{50} = 272,38 \mu\text{g/mL}$), lá ổi ($IC_{50} = 244,60 \mu\text{g/mL}$), lá xoài ($IC_{50} = 245,65 \mu\text{g/mL}$) và lá măng cầu xiêm ($IC_{50} = 223,12 \mu\text{g/mL}$).

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

MỤC LỤC

TÓM TẮT	i
MỤC LỤC	ii
TỪ VIẾT TẮT	iv
DANH SÁCH BẢNG	v
DANH SÁCH HÌNH	vi
LỜI CẢM ƠN	viii
PHẦN MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Tổng quan nghiên cứu	2
2.1 Khái niệm	2
2.2 Phân loại bệnh Đái tháo đường	2
2.3 Bệnh Đái tháo đường type 2	3
2.4 Giới thiệu về nguyên liệu	7
2.4.1 Măng cầu Xiêm	8
2.4.2 Măng cầu ta	9
2.4.3 Bình bát	10
2.4.4 Xoài	10
2.4.5 Ổi	11
2.5 Tổng quan về enzyme α -amylase và α -glucosidase	12
2.5.1 Khái niệm về enzyme	12
2.5.2 Chất ức chế enzyme	12
2.5.3 Enzyme α -amylase (EC 3.2.1.1)	14
2.5.4 Enzyme α -glucosidase (EC 3.2.1.20)	15
2.5.5 Cơ chế sinh học ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các hợp chất có hoạt tính sinh học	16
2.5.6 Chất ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase	17
2.6 Sơ lược về gốc tự do và chất chống oxy hóa	18
2.6.1 Gốc tự do	18
2.6.2 Lợi ích của gốc tự do đối với cơ thể	19
2.6.3 Tác hại của gốc tự do đối với cơ thể	20
2.6.4 Các chất chống oxy hóa	20
2.6.5 Stress oxy hóa và hậu quả của nó ở bệnh đái tháo đường	22
2.7 Tình hình nghiên cứu khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase trong và ngoài nước	22
2.7.1 Trên Thế giới	22
2.7.2 Ở Việt Nam	24
3. Mục tiêu của đề tài	25
4 Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu	25
4.1 Đối tượng, phạm vi nghiên cứu	25
4.2 Phương pháp nghiên cứu	25
NỘI DUNG	26
CHƯƠNG I	26
KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ ĐẾN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α -AMYLASE	26

CHƯƠNG 2.....	35
KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ ĐẾN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α - GLUCOSIDASE.....	35
CHƯƠNG III.....	44
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ	44
CHƯƠNG IV	52
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ.....	52
PHẦN KẾT LUẬN.....	59
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	60

TỪ VIẾT TẮT

ADA	American Diabetes Association
DMSO	Dimethyl sulfoside
ĐTĐ	Đái tháo đường
DPPH	2,2-diphenyl-1-ptycrylhydrazyl
IDF	International Diabetes Federation
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adulthood
OD	Optical Density
THA	Tăng huyết áp
pNPG	Para-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SU	Sulfonylurea
HLA	Human Leucocyst Antigen

DANH SÁCH BẢNG

Bảng 1: Các hợp chất tự nhiên ức chế enzyme α -amylase (Sales et al., 2012).	17
Bảng 2: Các hợp chất tự nhiên ức chế enzyme α -glucosidase (Kumar et al., 2011).	18
Bảng 3: Các ROS và RNS trong cơ thể sinh học (Proctor, 1989).	19
Bảng 4: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -amylase.	29
Bảng 5: Kết quả độ ẩm và hiệu suất trích cao ethanol của các mẫu lá.	33
Bảng 6: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.	35
Bảng 10: Bố trí thí nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết ethanol từ các mẫu lá bằng phương pháp DPPH.	45
Bảng 11: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose.	47
Bảng 12: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá.	48
Bảng 13: Giá trị IC ₅₀ của cao chiết ethanol từ các mẫu lá và Acarbose ức chế enzyme α -glucosidase.	51
Bảng 13: Khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol từ các mẫu lá.	52
Bảng 14. Khả năng khử gốc tự do của Vitamin C bằng phương pháp DPPH.	56
Bảng 15. Giá trị IC ₅₀ của cao chiết ethanol lá khoai lang tím và Vitamin C	58

DANH SÁCH HÌNH

Hình 1: Măng cầu xiêm.....	8
Hình 2: Măng cầu ta.....	9
Hình 3: Bình bát.....	10
Hình 4: Xoài.....	11
Hình 5: ổi.....	11
Hình 6: Cơ chế ức chế hai enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao chiết (Hogan, 2009).....	16
Hình 7: Flavonoid	22
Hình 8: Sơ đồ bố trí tổng quát thí nghiệm.	26
Hình 9: Sơ đồ tóm tắt quy trình trích cao của các mẫu lá.....	27
Hình 10: Quy trình khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase.....	31
Hình 11. Quá trình chiết cao ethanol.	33
Hình 12: Quy trình khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.	37
Hình 13: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của Acarbose.	38
Hình 14: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá măng cầu Xiêm.	40
Hình 15: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của.....	40
Hình 16: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.	41
Hình 17: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Xoài.....	41
Hình 18: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Ổi.....	42
Hình 19: Cơ chế phản ứng trung hòa gốc tự do DPPH.....	44
Hình 20: Quy trình thử hoạt tính kháng oxy hóa bằng DPPH.	46
Hình 21: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose.....	48
Hình 22: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá măng cầu xiêm.	49
Hình 23: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá măng cầu ta.	49
Hình 24: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.	50
Hình 25: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Xoài.	50
Hình 26: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Ổi.	50
Hình 27: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Măng cầu xiêm.	53
Hình 28: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Măng cầu ta.	54
Hình 29: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.	55

Hình 30: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH cao chiết ethanol mẫu lá ổi	55
Hình 31: Khả năng ức chế DPPH cao chiết ethanol mẫu lá xoài.	56
Hình 32. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm gốc tự do vào nồng độ Vitamin C.	57

LỜI CẢM ƠN

Qua thời gian thực hiện đề tài đã giúp tôi rèn luyện khả năng làm việc độc lập, học cách tiếp cận với những vấn đề mới, giúp tôi có điều kiện tiếp xúc, điều khiển trực tiếp các thiết bị tại Phòng Thí Nghiệm Sinh Hóa, Viện NC&PT Công nghệ sinh học, trường Đại học Cần Thơ cùng với sự hỗ trợ của Ban Giám Hiệu, phòng Khoa học Công nghệ, phòng Kế hoạch – Tài vụ của trường Đại học Trà Vinh tạo điều kiện cho tôi thực hiện đề tài này. Để hoàn thành được đề tài này có sự đóng góp không nhỏ của Quý thầy cô, bạn bè và người thân. Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến:

- Thầy Nguyễn Minh Chơn đã tận tình hướng dẫn, cung cấp tài liệu và truyền đạt nhiều kiến thức cũng như kinh nghiệm quý báu giúp tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học cấp Trường, trường Đại học Trà Vinh

- Ban Giám Hiệu, phòng Khoa học Công nghệ, phòng Kế hoạch – Tài vụ của trường Đại học Trà Vinh, Quý thầy, cô, các anh, chị, các bạn của phòng thí nghiệm Sinh Hóa, Viện NC&PT Công nghệ sinh học, trường Đại học Cần Thơ, cùng với sự hỗ trợ của đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Sau cùng, tôi xin kính chúc Ban Giám Hiệu, phòng Khoa học Công nghệ, phòng Kế hoạch – Tài vụ của trường Đại học Trà Vinh, Quý thầy cô và các anh, chị, các bạn Phòng Thí Nghiệm Sinh Hóa, Viện NC&PT Công nghệ sinh học, trường Đại học Cần Thơ, các bạn học viên cao học, sinh viên đại học phòng thí nghiệm Sinh hóa luôn dồi dào sức khỏe và thành công trong công việc cũng như trong cuộc sống./.

PHẦN MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh do sự rối loạn chuyển hóa carbohydrate khi hormone insulin của tuyến tụy bị thiếu hay giảm tác động trong cơ thể. ĐTĐ biểu hiện bằng lượng glucose trong máu cao hơn bình thường, do đó kiểm soát lượng glucose là một mục tiêu quan trọng để làm giảm nguy cơ biến chứng sức khỏe lâu dài của bệnh ĐTĐ. Carbohydrate là nguồn cung ứng lớn glucose trong cơ thể. Phân tử carbohydrate bị thủy phân thành các oligosaccharide bởi enzyme α -amylase (tụy tạng tiết ra); tiếp theo ở màng ruột non, enzyme α -glucosidase thủy phân oligosaccharide thành glucose và sau đó thẩm thấu vào máu. Do đó, ức chế được 2 enzyme này thì lượng glucose trong máu sẽ giảm, việc điều trị ĐTĐ sẽ dễ dàng hơn.

Sự phát triển của ĐTĐ do nhiều nguyên nhân trong đó nguyên nhân chính là stress oxy hóa. Stress oxy hóa dẫn đến tạo thành các gốc tự do là yếu tố chính của sự phát triển bệnh và những biến chứng phức tạp của ĐTĐ (Tripathi and Chandra, 2009). ĐTĐ có thể trực tiếp hay gián tiếp gây nên các rối loạn như tăng đường huyết, bệnh vông mạc, suy thận, bệnh thiếu máu tim, bệnh thần kinh, xơ vữa động mạch (Dutta, 2015).

Hiện nay, đái tháo đường được kiểm soát bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng thuốc duy trì lượng glucose trong máu ổn định Sulfonylurea (SU). Tuy nhiên, SU sử dụng càng dài thì tác dụng hạ đường huyết càng nặng từ 12-24 giờ và có thể sử dụng 1 lần/ngày và một số tác dụng phụ từ việc sử dụng SU như tăng cân, buồn nôn, ối mửa, vàng da, giảm tiểu cầu,... Ngoài ra còn có nhóm Biguanide (Metformin) cũng có tác dụng điều trị tiểu đường, tuy nhiên, Biguanide còn có tác dụng phụ như tiêu chảy, chán ăn, buồn nôn... (Trần Thị Thu Hằng, 2007); chất ức chế tiêu hóa và hấp thu tinh bột (Glucobay); thuốc cảm ứng độ nhạy của insulin. Nhìn chung, các liệu pháp này có tác dụng nhất định, công dụng chính của các nhóm thuốc này là hạ đường huyết hoặc cung cấp insulin thay thế tạm thời cho người đái tháo đường. Trong tất cả các loại thuốc điều trị đái tháo đường, phần lớn thường có thêm tác dụng phụ như béo phì, vàng da, suy đường huyết, ngộ độc gan... (Nathan et al., 2006; Đái Thị Xuân Trang và ctv., 2012). Sản phẩm VOSCAP

là sự phối hợp chiết xuất từ lá vối, lá ổi, lá sen đã được thử nghiệm đánh giá hiệu quả kiểm soát glucose máu trên chuột khỏe mạnh và chuột ĐTĐ type 2 (Trương Tuyết Mai và ctv., 2012).

Theo Liên đoàn Đái tháo đường quốc tế (IDF- International Diabetes Federation) năm 2010, định nghĩa đái tháo đường (ĐTĐ) là *“nhóm những rối loạn không đồng nhất gồm tăng đường huyết và rối loạn dung nạp glucose do thiếu insulin, do giảm tác dụng của insulin hoặc cả hai. Đái tháo đường type 2 đặc trưng bởi kháng insulin và thiếu tương đối insulin, một trong hai rối loạn này có thể xuất hiện ở thời điểm có triệu chứng lâm sàng bệnh đái tháo đường”*

Xu hướng hiện nay trên Thế giới và Việt Nam, nghiên cứu và phát triển các thuốc hạ đường huyết có nguồn gốc thực vật, đặc biệt là những cây thuốc đã được sử dụng phổ biến trong dân gian nhằm tìm những thuốc mới hiệu quả và không gây tác dụng phụ so với các thuốc hóa dược là rất cần thiết. Chính vì vậy, các nhà khoa học đang nghiên cứu nhằm tìm kiếm những chế phẩm trị liệu đái tháo đường hiệu quả có nguồn gốc từ các nguồn thực vật, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi để người bệnh và thầy thuốc có thêm lựa chọn.

2. Tổng quan nghiên cứu

2.1 Khái niệm

Theo Liên đoàn Đái tháo đường quốc tế (IDF- International Diabetes Federation) năm 2010, định nghĩa ĐTĐ là *“nhóm những rối loạn không đồng nhất gồm tăng đường huyết và rối loạn dung nạp glucose do thiếu insulin, do giảm tác dụng của insulin hoặc cả hai. Đái tháo đường type 2 đặc trưng bởi kháng insulin và thiếu tương đối insulin, một trong hai rối loạn này có thể xuất hiện ở thời điểm có triệu chứng lâm sàng bệnh đái tháo đường”*.

2.2 Phân loại bệnh Đái tháo đường

Trong những năm 1999, 2003 và 2006, Ủy ban chuyên gia của Hội Đái tháo đường Mỹ, Hội Đái tháo đường Châu Âu phân loại như sau:

ĐTĐ type 1: tế bào β sinh kháng thể bị phá hủy và gây thiếu hụt insulin tuyệt đối, được chia làm hai thể là do cơ chế tự miễn và không tự miễn, không phụ thuộc kháng thể kháng bạch cầu ở người (Human Leucocyst Antigen: HLA).

ĐTĐ type 2: đặc trưng bởi kháng insulin, giảm tiết insulin, tăng sản xuất glucose từ gan và bất thường chuyển hóa mỡ. Béo phì đặc biệt mỡ nội tạng hoặc béo phì trung tâm là phổ biến nhất trong ĐTĐ type 2 (Powers, 2008).

Các loại đặc hiệu khác như ĐTĐ do thiếu hụt chức năng tế bào β di truyền (Mody 1, 2, 3, 4, 5, 6), thiếu hụt hoạt động insulin do di truyền, các bệnh tuyến tụy ngoại tiết, các bệnh nội tiết như hội chứng đa nội tiết tự miễn, Cushing, u tế bào tiết glucagon, u tụy thượng thận, cường giáp, u tế bào tiết somatin, u vỏ thượng thận, ĐTĐ do thuốc hoặc hóa chất, do nhiễm trùng, hoặc các type ĐTĐ do trung gian tự miễn như hội chứng Stiff-Man, Down, Klinefelter và Turner,...

ĐTĐ thai nghén là ĐTĐ phát hiện lần đầu lúc mang thai và sau khi sinh phần lớn glucose máu trở về bình thường, một số ít tiến triển thành ĐTĐ type 2 (Trần Thị Minh Diễm và Đào Thị Dừa, 2010). ĐTĐ thai kỳ có xu hướng gặp ở phụ nữ thừa cân, béo phì, nhiều tuổi hay phụ nữ sinh đẻ nhiều lần (Tạ Văn Bình, 2007).

ĐTĐ thể LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adulthood) là ĐTĐ tự miễn nhưng xảy ra ở người lớn (Nguyễn Thy Khuê, 2009).

Gần đây, người ta khám phá ra não có sản xuất insulin. Thiếu insulin và glucose trong máu cao là những yếu tố chính ảnh hưởng xấu đến chức năng của não, hậu quả là gia tăng nguy cơ bệnh Alzheimer's và chứng mất trí. Tình trạng này được đề cập như ĐTĐ type 3 (Kraft, 2011).

2.3 Bệnh Đái tháo đường type 2

a/ Nguyên nhân giảm tiết insulin

Tế bào β của tuyến tụy bị tổn thương nên không thể sản sinh ra insulin. Nguyên nhân gây bệnh chủ yếu là do cơ chế tự miễn (Thái Hồng Quang, 2008).

Rối loạn tiết insulin: Tế bào β của tuyến tụy bị rối loạn về khả năng sản xuất insulin bình thường về mặt số lượng cũng như chất lượng để đảm bảo cho chuyển hóa glucose bình thường. Những rối loạn đó có thể là bất thường về nhịp tiết và động học của bài tiết insulin, bất thường về số lượng tiết insulin, bất thường về chất lượng những tế bào peptide có liên quan đến insulin trong máu. Nguyên nhân có sự rối loạn tiết insulin có thể do một số yếu tố sau: Sự tích tụ triglycerides và acid béo tự do trong máu dẫn đến tăng sự tích tụ triglycerides là nguyên nhân gây “ngộ độc lipid” ở tụy, tăng nhạy cảm tế bào β với chất ức chế trương lực α -adrenergic.

Kháng insulin: Ở bệnh nhân ĐTĐ type 2, insulin không có khả năng thực hiện những tác động của mình như người bình thường, kháng insulin chủ yếu được nghiên cứu ở gan và cơ. (i) Kháng insulin ở cơ: Các nghiên cứu đã đề xuất nguyên nhân kháng insulin là vai trò của di truyền, hiện tượng giảm hoạt tính của enzyme trong quá trình oxy hoá glucose do tăng acid béo tự do sinh ra từ quá trình phân huỷ lipid; (ii) Kháng insulin ở gan: là vai trò của tăng glucagon và tăng hoạt tính men PEP-CK.

Một số tình trạng sinh lý và bệnh lý gây ra sự giảm nhạy cảm insulin như béo phì, thai nghén, bệnh cấp tính, ĐTĐ type 2. Khi tiết insulin bị thiếu do sự kháng insulin và giảm tiết insulin là cơ sở xảy ra ĐTĐ type 2 (Powers, 2008). Quá trình thu nạp glucose ở các cơ quan, cần có sự phối hợp chặt chẽ giữa sự nhạy cảm của các cơ quan với insulin, với acid béo tự do. Các acid béo tự do ở nồng độ sinh lý ức chế mạnh sự gắn của insulin vào tế bào gan. Tăng nồng độ acid béo tự do cũng kích thích quá trình tăng sinh glucose tại gan, do đó tăng glucose máu và đề kháng insulin. Giảm hoạt tính kinase ở thụ thể có thể là cơ chế chính trong đề kháng insulin trên bệnh nhân ĐTĐ type 2. Khiếm khuyết tại thụ thể và sau thụ thể góp phần đề kháng insulin, giảm gắn insulin là vấn đề chính giai đoạn tiền ĐTĐ (Nguyễn Hải Thủy, 2006).

Nhiều tác giả chứng minh rằng có liên quan giữa nồng độ insulin và một số rối loạn sinh lý và chuyển hóa như tăng huyết áp, rối loạn lipid máu, giảm dung nạp glucose (Hippisley, 2009). Giai đoạn sớm, kháng insulin biểu hiện bởi sự gia tăng tiết insulin nhằm hạ glucose máu, chức năng tế bào β còn đảm bảo nên glucose máu vẫn bình thường. Vào giai đoạn muộn, theo thời gian khi tế bào β bắt đầu suy giảm về số lượng và chất lượng, sự tiết insulin sẽ giảm xuống và ĐTĐ type 2 sẽ xuất hiện. Đặc điểm ĐTĐ type 2 ở bệnh nhân tuổi cao là nồng độ insulin trung bình giảm, chỉ số kháng insulin tăng cao, chỉ số chức năng tiết insulin của tế bào β giảm rõ (Hoàng Trung Vinh, 2006).

b/ Rối loạn sự điều tiết Leptin, Resistin, Adiponectin

Mô mỡ tiết ra Leptin là một hormone protein có tác dụng tác động lên các hoạt động của cơ thể như: tác động lên sự điều hòa thể trọng, chuyển hóa, chức năng sinh sản và nhiều tác dụng khác. Đặc biệt là Leptin điều hòa nồng độ đường trong

máu thông qua hai con đường là kiểm soát sự ngon miệng và tích trữ năng lượng, thông tin cho gan về sử dụng glucose dự trữ. Khi hai con đường trên bị phá vỡ sẽ dẫn đến bệnh ĐTD (Trần Hữu Dàng, 2006). Khi khối mô mỡ tăng thì làm gia tăng Leptin cùng với sự chuyển hóa bù trừ cho bảo tồn sự nhạy cảm của insulin (Polyzos *et al.*, 2011). Resistin là hormone được tiết ra từ mô mỡ. Trong quá trình biệt hóa mô mỡ thì nồng độ của Resistin sẽ tăng lên. Nồng độ của Resistin máu tăng lên ở người béo phì do chế độ ăn hoặc nguồn gốc di truyền. Giữa béo phì và ĐTD có mối liên kết của Resistin, đó chính là nguyên nhân dẫn đến ĐTD type 2 (Nguyễn Hải Thủy, 2006).

c) Yếu tố nguy cơ

Yếu tố tuổi: Nguy cơ ĐTD tăng theo dần theo quá trình lão hóa. Ở các nước phát triển ĐTD thường tập trung ở lứa tuổi trên 45. Những thay đổi cấu trúc cơ thể với tình trạng tích mỡ bụng, giảm vận động ở tuổi trung niên và già làm giảm năng lượng tiêu hao dễ dẫn đến tích lũy mỡ bụng gây tình trạng đề kháng Insulin (Khan *et al.*, 1990).

Yếu tố gia đình: Khoảng 10% bệnh nhân mắc bệnh ĐTD type 2 có bà con thân thuộc cũng bị mắc bệnh ĐTD type 2. Nghiên cứu trên những gia đình bệnh nhân mắc bệnh ĐTD type 2 thấy: có khoảng 6% anh chị em ruột cùng mắc bệnh ĐTD type 2 và khi bố mẹ bị bệnh ĐTD type 2, 5% con cái của họ sẽ mắc bệnh ĐTD type 2. Hai trẻ sinh đôi cùng trứng, một người mắc bệnh ĐTD type 2, người kia sẽ bị xếp vào nhóm đe dọa thực sự sẽ mắc bệnh ĐTD type 2 (Tạ Văn Bình, 2008).

Yếu tố chủng tộc: Tỷ lệ ĐTD type 2 gặp ở tất cả các dân tộc, nhưng với tỷ lệ và mức độ hoàn toàn khác nhau. Ở các dân tộc khác nhau, tỷ lệ mắc bệnh ĐTD thai kỳ cũng khác nhau, những dân tộc có tỷ lệ mắc bệnh ĐTD type 2 cao, thì có tỷ lệ mắc bệnh ĐTD thai kỳ cao (Tạ Văn Bình, 2008).

Yếu tố môi trường và lối sống: Khi ăn uống không hợp lý sẽ dẫn đến sự mất cân bằng và dư thừa năng lượng, kết hợp với lối sống tĩnh tại, ít hoạt động thúc đẩy nhanh quá trình tiến triển của bệnh, làm tăng nhanh tỷ lệ mắc bệnh ĐTD type 2 (Tạ Văn Bình, 2008). Ở Việt Nam, người sống ở đô thị có tỷ lệ mắc bệnh ĐTD type 2 cao hơn ở nông thôn: Hà Nội, tỷ lệ mắc bệnh ĐTD type 2 khu vực thành thị 1,4% so với nông thôn 0,96%. Ở Huế, tỷ lệ trên là 1,05% so với 0,60%. Như vậy,

sự đô thị hoá là yếu tố nguy cơ quan trọng và độc lập của ĐTĐ type 2 (Tạ Văn Bình , 2003).

Tiền sử sinh con nặng trên 4 kg: Trẻ mới sinh nặng > 4 kg là một yếu tố nguy cơ của bệnh ĐTĐ type 2 cho cả mẹ và con. Các bà mẹ này có nguy cơ mắc ĐTĐ type 2 cao hơn so với phụ nữ bình thường. Những trẻ này thường bị béo phì từ nhỏ, rối loạn dung nạp glucose và bị ĐTĐ type 2 khi lớn tuổi (Tạ Văn Bình , 2008).

Tiền sử giảm dung nạp glucose: Những người có tiền sử giảm dung nạp glucose, thì khả năng tiến triển thành bệnh ĐTĐ type 2 rất cao. Những người bị rối loạn dung nạp glucose và rối loạn glucose máu lúc đói nếu biết sớm chỉ cần can thiệp bằng chế độ ăn và luyện tập sẽ giảm hẳn nguy cơ chuyển thành bệnh ĐTĐ type 2 thực sự (Tạ Văn Bình , 2008).

Tăng huyết áp: Tăng huyết áp (THA) được coi là nguy cơ phát triển bệnh ĐTĐ type 2. Đa số bệnh nhân ĐTĐ type 2 có THA và tỷ lệ ĐTĐ type 2 ở người bệnh THA cũng cao hơn rất nhiều so với người bình thường cùng lứa tuổi. Tỷ lệ THA ở bệnh nhân ĐTĐ type 2 đều tăng theo tuổi đời, tuổi bệnh, BMI, nồng độ glucose máu,...(Tạ Văn Bình , 2008).

Béo phì: Mặc dù sinh bệnh học của ĐTĐ rất phức tạp, béo phì toàn thân trung tâm là một trong những nguyên nhân chính gây tình trạng đề kháng Insulin, cùng các rối loạn chuyển hóa khác như THA và rối loạn mỡ máu đều có khả năng tiến triển thành ĐTĐ nếu không được kiểm soát tốt. Ảnh hưởng của béo phì đến ĐTĐ có thể điều chỉnh bằng thay đổi lối sống. Dung nạp glucose máu có thể được cải thiện nếu gia tăng hoạt động thể lực và kiểm soát tốt trọng lượng, từ đó giảm nguy cơ tiến triển thành bệnh ĐTĐ. Ở Việt Nam, điều tra dịch tễ học tại Huế cho thấy: béo phì chiếm 12,5% tổng số người bị bệnh ĐTĐ, trong đó nam chiếm 35,42% (Tạ Văn Bình , 2008).

Chế độ ăn và hoạt động thể lực: Nhiều công trình nghiên cứu dịch tễ học cho thấy: những người có thói quen dùng nhiều đường sacarose, ăn nhiều chất béo sẽ có nguy cơ bị ĐTĐ type 2. Tình trạng ăn quá nhiều chất béo đã được nhiều tác giả chứng minh là những yếu tố nguy cơ gây bệnh ĐTĐ type 2 ở 12 người. Những

người có thói quen uống nhiều rượu, có nguy cơ mắc bệnh ĐTD type 2 lớn hơn những người uống ít rượu và ăn uống điều độ.

d) Hậu quả

Bệnh ĐTD là bệnh nguy hiểm đe dọa đến tính mạng và gây ra nhiều biến chứng. Theo hiệp hội ĐTD quốc tế, ĐTD là nguyên nhân tử vong đứng hàng thứ 4 hoặc thứ 5 ở các nước phát triển và đang được coi là dịch bệnh ở các nước đang phát triển. Khoảng 50% bệnh nhân ĐTD bị các biến chứng như bệnh mạch vành, tim mạch, đột quỵ, bệnh lý thần kinh do ĐTD, cắt đoạn chi, suy thận, mù mắt. Biến chứng này dẫn đến tàn tật và giảm tuổi thọ (Leung and Lam, 2000).

ĐTD là vấn đề nan giải, gánh nặng đối với sự phát triển kinh tế và xã hội vì sự phổ biến của bệnh và hậu quả nặng nề của bệnh do phát hiện và điều trị muộn. Năm 1997, cả thế giới đã chi 1.030 tỷ USD cho điều trị ĐTD trong đó chủ yếu chi cho các biến chứng ĐTD trung bình chi phí cho mỗi bệnh nhân bị biến chứng ĐTD trên 30 năm là 47.420 USD (Caro et al., 2002). Trung Quốc là một trong những quốc gia có số người mắc ĐTD cao nhất thế giới. Năm 2007, chi cho bệnh ĐTD và biến chứng ĐTD là 26 tỷ USD, dự kiến năm 2030 tăng lên 47,2 tỷ USD (Weibing et al., 2009).

Tăng nồng độ glucose máu là nguyên nhân chính dẫn đến biến chứng mạn tính của ĐTD đặc biệt là biến chứng mạch máu. Chính vì thế trên thế giới có rất nhiều nghiên cứu về vai trò của kiểm soát glucose máu đối với các biến chứng mạn tính bệnh nhân ĐTD. Các biến chứng mạn tính thường gặp: biến chứng mạch máu lớn và biến chứng mạch máu nhỏ (Cockram, 2000; Leung and Lam, 2000; Gopa and Lan, 2004).

2.4 Giới thiệu về nguyên liệu

Các loài thực vật lá mãng cầu xiêm, lá mãng cầu ta, lá xoài là một trong những loài thực vật được trồng phổ biến tại Trà Vinh. Bên cạnh đó, lá bình bát là một loài thực vật mọc hoang cặp ao bờ ruộng chiếm lượng lớn và có sức sống mạnh. Các loài thực vật này chưa được nghiên cứu về các hoạt tính sinh học cũng như khả năng ứng dụng các phụ phẩm vào đời sống. Vì vậy, đề tài chọn 4 đối tượng trên thực hiện nghiên cứu cho đề tài, mẫu được

thu ở các huyện Cầu Ngang, Duyên Hải, Cầu Kè, Trà Cú, Càng Long, Châu Thành và Tiểu Cần tại tỉnh Trà Vinh.

2.4.1 Mãng cầu Xiêm

Giới Plante

Bộ Magnoliales

Họ Annonaceae

Chi Annona

Loài *A. Muricata*



Hình 1: Mãng cầu xiêm

Mãng cầu Xiêm, còn gọi là mãng cầu gai, na Xiêm, na gai (danh pháp hai phần: *Annona muricata*) tùy theo vùng trồng, chiều cao từ 3-10m, rậm, lá màu đậm, không lông, xanh quanh năm. Hoa màu xanh, mọc ở thân. Quả mãng cầu xiêm to và có gai mềm. Thịt quả ngọt và hơi chua, hạt có màu nâu sậm. Cây mãng cầu xiêm là cây bản địa của vùng Trung Mỹ như Mexico, Cuba, vùng Caribe, và phía bắc của Nam Mỹ chủ yếu ở Brasil, Colombia, Peru, Ecuador, và Venezuela. Cây cũng được trồng ở Mozambique, Somalia, Uganda. Ngày nay nó cũng được trồng ở một số vùng ở Đông Nam Á, cũng như ở một số đảo Thái Bình Dương. Cây mãng cầu Xiêm sống ở những khu vực có độ ẩm cao và có mùa Đông không lạnh lắm, nhiệt độ dưới 5°C sẽ làm lá và các nhánh nhỏ hỏng và nhiệt độ dưới 3°C thì cây có thể chết. Cây mãng cầu xiêm được trồng làm cây ăn quả. Quả mãng cầu Xiêm lớn hơn mãng cầu ta rất nhiều, có khi đến có thể nặng tới 6,8 kg, có lẽ về độ lớn nó chỉ thua quả na rừng, vỏ ngoài nhẵn chỉ phân biệt múi nọ với múi kia nhờ mỗi múi có một cái gai cong, mềm vì vậy còn có tên là mãng cầu gai. Trong 100g mãng cầu xiêm chứa 16,84g carbohydrates, 0,3g chất béo, 1g protein, vitamin (B1, B2, B3, B5, B6, B9, C) và các chất khoáng (sắt, canxi, phospho, kali, natri, kẽm),... Tại Việt

Nam, trái cây này được gọi là Mãng Cầu Xiêm ở phía Nam, hoặc Mãng Cầu ở phía bắc, và được dùng để làm sinh tố, làm nước quả hoặc ăn tráng miệng

2.4.2 Mãng cầu ta

Giới Plante

Bộ Magnoliales

Họ Annonaceae

Chi Annona

Loài *A. Squamosa*



Hình 2: Mãng cầu ta

Na, hay còn gọi là mãng cầu ta, mãng cầu dai/giai, sa lê, phan lệ chi, (danh pháp hai phần: *Annona squamosa*), là một loài thuộc chi Na (*Annona*) có nguồn gốc ở vùng châu Mỹ nhiệt đới. Nguồn gốc bản địa chính xác của loại cây này chưa rõ do hiện nay nó được trồng khắp nơi nhưng người ta cho rằng đây là cây bản địa của vùng Caribe. Cây na cao cỡ 2–5 mét, lá mọc xen ở hai hàng; hoa xanh, quả tròn có nhiều múi (thực ra mỗi múi là một quả), hạt trắng có màu nâu sậm. Hạt có chứa độc tố, có tính làm bong da và có thể trừ sâu bọ, chảy rận. Ở miền Bắc, quả na được phân thành hai loại là na dai và na bờ dựa vào đặc tính của quả (sự liên kết giữa các múi với vỏ và giữa các múi với nhau). Na dai có ưu điểm ăn ngọt, để được lâu, không dễ nát, dễ bóc vỏ, múi na nhẵn dễ tróc ra khỏi hạt và múi cũng dai hơn. Quả na dai có vỏ mềm, màu xanh, thịt trắng lại ít hạt. Thêm vào đó, na dai được ưa chuộng hơn bởi mùi thơm và vị ngọt sắc nổi bật hơn so với na bờ. Huyện Chi Lăng (Lạng Sơn) được coi là "vựa na" lớn nhất cả nước, nơi này có 2 khu vực trồng na nổi tiếng: na bờ ở khu vực thị trấn Đồng Mỏ và na dai khu vực Đồng Bành. Ở miền Nam có mãng cầu dai hay còn gọi là mãng cầu Cáp (mãng cầu Vũng Tàu). Mãng cầu dai chắc, nhiều thịt, ít hạt, vỏ mỏng và ngọt hơn các loại mãng cầu khác.

Những quả măng cầu Cáp có vỏ xù xì, mùi không đều, không mọng, nhưng có vị thơm và ngọt sắc.

2.4.3 Bình bát

Giới Plante

Bộ Magnoliales

Họ Annonaceae

Chi Annona

Loài *A. Reticulata*



Hình 3: Bình bát

Bình bát hay còn gọi là nê (tên khoa học: *Annona reticulata*), một số ngôn ngữ châu Âu gọi là tim bò, tiếng Hindi gọi là sitaphal, tức quả Sita, là một loài thực vật thuộc chi Na (*Annona*). Cây gỗ nhỏ, sớm hay nửa rụng lá. Thân cao 2 – 5 m, thậm chí đến 10 m. Lá đơn, mọc so le, nhọn hai đầu, có 8 - 9 cặp gân phụ, dài 10–15 cm và rộng 5–10 cm. Hoa vàng, hai vòng cánh, nhiều nhị đực và tâm bì. Quả hình tim (quả kép, như các loại na), mặt ngoài có từng ô 5 góc mở; thịt quả trắng hoặc hơi hồng, ăn được. Hạt có tính sát khuẩn. Trái bình bát (na xiêm) ngoài vị ngọt thanh còn chứa: vitamin C giúp chống gốc tự do gây lão hóa sớm; vitamin A giúp da và tóc khỏe, hỗ trợ thị lực; vitamin B6, magnesium, potassium, chất xơ tốt cho hệ tim mạch, hệ tiêu hóa, có tác dụng lợi tiểu và giảm trầm cảm; có tính giảm co thắt, giảm axit tại các khớp xương, giúp trị bệnh huyết trắng ở phụ nữ. Thường phổ biến ở vùng đất thấp, có khí hậu nóng và ẩm. Loài này thường mọc hoang tại nhiều khu vực trên thế giới như Ấn Độ, Úc và châu Phi. Tại Việt Nam, thường mọc ven bờ kênh, rạch có nước phèn, nước lợ ở Nam Bộ và một số tỉnh đồng bằng Bắc Bộ. Do chịu được phèn nên có thể làm gốc ghép cho măng cầu xiêm.

2.4.4 Xoài

Giới Plante

Bộ Sapindales

Họ Anacardiaceae

Chi *Mangifera* L.



Hình 4: Xoài

Xoài là một loại trái cây vị ngọt thuộc chi Xoài, bao gồm rất nhiều quả cây nhiệt đới, được trồng chủ yếu như trái cây ăn được. Phần lớn các loài được tìm thấy trong tự nhiên là các loại xoài hoang dã. Xoài có nguồn gốc ở Nam Á và Đông Nam Á, từ đó nó đã được phân phối trên toàn thế giới để trở thành một trong những loại trái cây được trồng hầu hết ở vùng nhiệt đới.

2.4.5 Ổi

Giới Plante

Bộ Myrtales

Họ Myrtaceae

Chi *Psidium*

Loài *P. guajava*



Hình 5: Ổi

Ổi ta (danh pháp khoa học: *Psidium guajava*) là loài cây ăn quả thường xanh lâu năm, thuộc họ Đào kim nương, có nguồn gốc từ Brasil. Cây ổi nhỏ hơn

cây vải, nhãn, cao nhiều nhất 10m, đường kính thân tối đa 30 cm. Những giống mới còn nhỏ và lùn hơn nữa. Thân cây chắc, khỏe, ngắn vì phân cành sớm. Thân nhãn nhụi rất ít bị sâu đục, vỏ già có thể tróc ra từng mảng phía dưới lại có một lượt vỏ mới cũng nhẵn, màu xám, hơi xanh. Cành non 4 cạnh, khi già mới tròn dần, lá đôi xứng. Hoa lưỡng tính, bầu hạ, mọc từng chùm 2, 3 chiếc, ít khi ở đầu cành mà thường ở nách lá, cánh 5, màu trắng, nhiều nhị vàng, hạt phấn nhỏ rất nhiều, phôi cũng nhiều. Ngoài hoa thụ phấn dễ dàng nhưng cũng có thể tự thụ phấn. Quả to từ 4 – 5g đến 500 – 700 g gần tròn, dài thuôn hoặc hình chữ lê. Hạt nhiều, trộn giữa một khối thịt quả màu trắng, hồng, đỏ vàng. Từ khi thụ phấn đến khi quả chín khoảng 100 ngày. Hàm lượng dinh dưỡng trung bình trong 100 gam quả ổi: 1 gam protein, 15 mg canxi, 1 mg sắt, 0,06 mg retinol (vitamin A), 0,05 mg thiamin (vitamin B1) và 200 mg axit ascorbic (vitamin C).

2.5 Tổng quan về enzyme α -amylase và α -glucosidase

2.5.1 Khái niệm về enzyme

Trong cơ thể sống (các tế bào) luôn luôn xảy ra quá trình trao đổi chất. Sự trao đổi chất ngừng thì sự sống không còn tồn tại. Quá trình trao đổi của một chất là tập hợp của rất nhiều các phản ứng hóa học phức tạp. Các phản ứng này có liên quan chặt chẽ với nhau và điều chỉnh lẫn nhau. Enzyme là hợp chất protein xúc tác cho các phản ứng hóa học đó. Chúng có khả năng xúc tác đặc hiệu các phản ứng hóa học nhất định và đảm bảo cho các phản ứng xảy ra theo một chiều hướng nhất định với tốc độ nhịp nhàng trong cơ thể sống. Enzyme có trong hầu hết các loại tế bào của cơ thể sống. Chính do những tác nhân xúc tác có nguồn gốc sinh học nên enzyme còn được gọi là các chất xúc tác sinh học (biocatalysators) nhằm phân biệt với các chất xúc tác hóa học (Đỗ Quý Hai, 2006).

2.5.2 Chất ức chế enzyme

Chất ức chế enzyme là những chất làm giảm tốc độ phản ứng do enzyme xúc tác. Hoạt động của một enzyme có thể giết chết một mầm bệnh hoặc điều chỉnh lại sự không cân bằng trong chuyển hóa. Có nhiều loại thuốc ức chế enzyme, chúng cũng được sử dụng như là chất diệt cỏ và thuốc trừ sâu. Không phải tất cả các phân tử liên kết với enzyme đều là chất ức chế enzyme, những chất hoạt hóa liên kết với các enzyme và làm tăng hoạt tính enzyme mà chúng liên kết. Sự liên kết của một

chất ức chế có thể ngăn chặn một chất nền đi vào tâm hoạt động của enzyme và gây trở ngại cho các phản ứng xúc tác của enzyme đó. Chất ức chế có thể liên kết với enzyme thuận nghịch hoặc không thuận nghịch.

Chất ức chế không thuận nghịch thường phản ứng với enzyme và thay đổi nó về mặt hóa học. Những chất ức chế đó làm thay đổi dư lượng các acid amin quan trọng cần thiết cho hoạt động của enzyme. Ngược lại, chất ức chế thuận nghịch liên kết không đồng hóa trị và theo những kiểu khác nhau tùy thuộc vào liên kết chất ức chế-enzyme, phức enzyme-chất nền hoặc cả hai.

Chất ức chế thuận nghịch liên kết với enzyme bằng các tương tác không đồng hóa trị chẳng hạn như liên kết hydrogen, tương tác kỵ nước và liên kết ion. Nhiều liên kết yếu giữa các chất ức chế và tâm hoạt tính mạnh mẽ và đặc biệt. Ngược lại, đối với các chất nền và chất ức chế không thuận nghịch, các chất ức chế thuận nghịch thường không trải qua phản ứng hóa học khi liên kết với enzyme và có thể dễ dàng loại bỏ bằng cách pha loãng hoặc thẩm tách.

Có 4 kiểu của ức chế enzyme thuận nghịch, chúng được phân chia dựa theo tác động của sự thay đổi nồng độ chất nền của enzyme trên chất ức chế:

- Ức chế cạnh tranh (competitive inhibition): chất nền và chất ức chế không liên kết với enzyme cùng một lúc. Điều này có thể là do chất ức chế có ái lực với tâm hoạt động của một loại enzyme nên xảy ra sự cạnh tranh giữa chất nền và chất ức chế cạnh tranh vào tâm hoạt động của enzyme. Đây là loại ức chế có thể được khắc phục bằng nồng độ đủ cao của chất nền bởi vì những chất ức chế cạnh tranh thường có cấu trúc tương tự như cấu trúc của chất nền thật.

- Ức chế kháng cạnh tranh (uncompetitive inhibition): chất ức chế chỉ kết hợp với phức enzyme-chất nền mà không kết hợp với enzyme tự do. Đây là một dạng ức chế mà các liên kết của chất ức chế với enzyme làm giảm hoạt tính của nó nhưng không ảnh hưởng đến liên kết của enzyme-chất nền. Kết quả là mức độ của sự ức chế chỉ phụ thuộc vào nồng độ của chất ức chế.

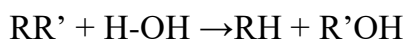
- Ức chế không cạnh tranh (noncompetitive inhibition): chất ức chế kết hợp với enzyme ở vị trí khác với vị trí kết hợp của chất nền tạo thành phức enzyme-chất nền-chất ức chế không bị chuyển hóa tiếp. Như vậy, enzyme có thể đồng thời kết hợp cả chất ức chế và chất nền. Chất nền và chất ức chế không cạnh tranh với nhau

để kết hợp với enzyme và cũng không thể loại trừ tác dụng kìm hãm bằng cách tăng nồng độ chất nền.

- Ức chế hỗn tạp (mixed inhibition): là chất ức chế không những liên kết với enzyme tự do mà còn liên kết với cả phức hợp enzyme-chất nền tạo thành phức hợp enzyme-chất ức chế-chất nền nên không tạo được sản phẩm. Hiện tượng ức chế chỉ phụ thuộc vào nồng độ chất ức chế. Tốc độ ức chế cực đại đo được khi không có chất ức chế là cao hơn khi có mặt chất ức chế (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2009).

2.5.3 Enzyme α -amylase (EC 3.2.1.1)

Enzyme amylase là một hệ enzyme phổ biến trong hệ sinh vật. Các enzyme này thuộc nhóm enzyme thủy phân, xúc tác phân giải liên kết nội phân tử trong nhóm polysaccharide với sự tham gia của nước.



Amylase thủy phân tinh bột, glycogen và dextrin thành glucose, maltose và dextrin hạn chế. Các enzyme amylase có trong nước bọt (còn được gọi là ptyalin), trong dịch tiêu hóa của người và động vật, trong hạt nảy mầm, nấm sợi, xạ khuẩn, nấm men và vi khuẩn. Ptyalin bắt đầu thủy phân tinh bột từ miệng và quá trình này hoàn tất ở ruột non nhờ amylase của tuyến tụy.

Có 6 loại enzyme được chia vào 2 nhóm: Endoamylase (enzyme nội bào) và exoamylase (enzyme ngoại bào)

+ Endoamylase gồm: α -amylase, pullulanase (hay α -dextrin 6-glucosidase), transglucosilase (hay oligo-1,6-glucosidase), amylo-1,6-glucosidase. Các enzyme này thủy phân các liên kết bên trong của chuỗi polysaccharide.

+ Exoamylase gồm: β -amylase và γ -amylase. Đây là những enzyme thủy phân tinh bột từ đầu không khử của chuỗi polysaccharide (Bộ Y tế, 2007).

Enzyme α -amylase có khả năng phân cắt các liên kết 1,4-glucoside nằm bên trong của phân tử cơ chất (tinh bột và glycogen) một cách ngẫu nhiên và vì thế gọi là enzyme nội bào. Enzyme α -amylase không chỉ có khả năng phân hủy hồ tinh bột mà còn có khả năng phân hủy các hạt tinh bột nguyên vẹn song với tốc độ rất chậm. Quá trình thủy phân tinh bột bởi enzyme α -amylase là quá trình đa giai đoạn:

+ Ở giai đoạn đầu (giai đoạn dextrin hóa): chỉ một số phân tử cơ chất bị thủy phân tạo thành một lượng lớn dextrin phân tử thấp (α -dextrin).

+ Giai đoạn 2 (giai đoạn đường hóa): các dextrin phân tử thấp tạo thành bị thủy phân tiếp tục tạo ra các tetra-trimaltose không màu với iode. Các chất này bị thủy phân rất chậm bởi α -amylase cho tới disaccharide và monosaccharide. Dưới tác dụng của α -amylase, amylose bị phân giải khá nhanh thành oligosaccharide gồm 6-7 gốc glucose.

+ Sau đó, các polyglucose này bị phân cách tiếp tục tạo nên các mạch polyglucose collagen cứ ngắn dần và bị phân giải tới maltotetrose, maltotriose và maltose.

Qua một thời gian tác dụng dài sản phẩm thủy phân của amylose chứa 13% glucose và 87% maltose. Tác dụng của enzyme này với amylopectin cũng tương tự nhau nhưng vì không phân cắt được liên kết 1,6-glucoside nên sản phẩm sẽ là 72% maltose, 19% glucose, dextrin thấp phân tử và 8% isomaltose.

Tóm lại, dưới tác dụng của α -amylase, tinh bột có thể chuyển thành maltotetrose, maltose, glucose và dextrin phân tử thấp.

2.5.4 Enzyme α -glucosidase (EC 3.2.1.20)

Enzyme α -glucosidase còn có những tên gọi khác như maltase, transglucosidase, glucoinvertase, nitrophenyl α -D-glucosidase, glucosidoinvertase, glucosidosucrase, oligo-1,6-glucosidase, maltaseglucoamylase, α -glucopyranosidase, glucosidoinvertase, α -D-glucosidase, α -glucosidase hydrolase, α -1,4-glucosidase, thuộc nhóm hydrolase (nhóm enzyme xúc tác các phản ứng thủy phân).

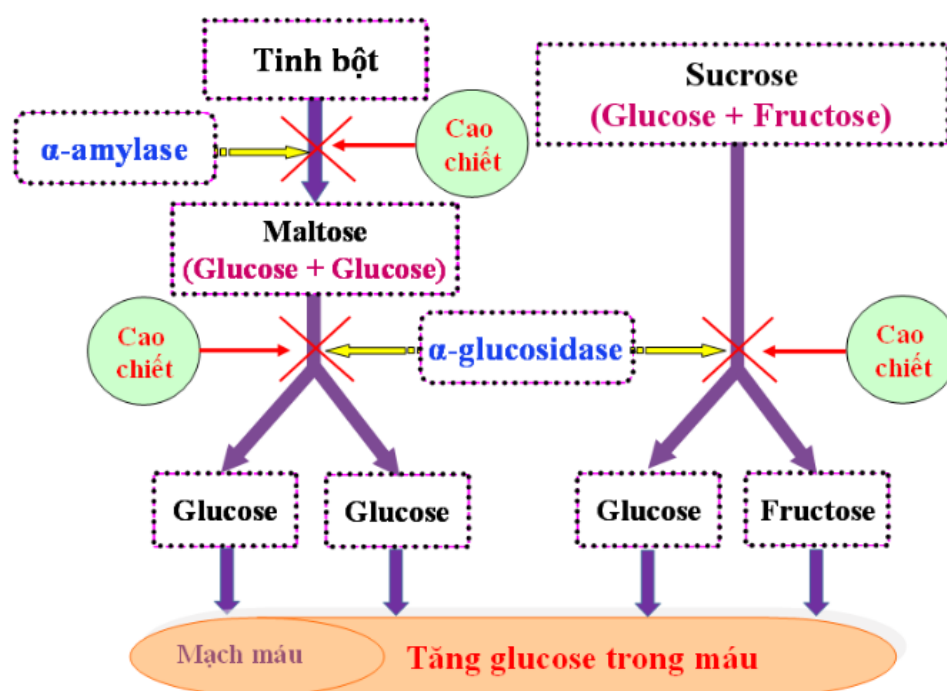
Enzyme α -glucosidase là một enzyme một thành phần, có hoạt tính exohydrolysis, xúc tác phản ứng thủy phân liên kết α -1,4-glycoside ở đầu tận cùng không khử của carbohydrate giải phóng các phân tử α -D-glucose. Chất nền đặc trưng của enzyme α -glucosidase là các disaccharide, oligosaccharide, các aryl- và alkyl- α -glucopyranoside khác (Schomburg and Salzmann, 1991; Uzma và Mohammad, 2008). Enzyme α -glucosidase là một trong những enzyme thuộc lớp glycoside hydrolase. Glycoside hydrolase là một lớp các enzyme thường tách liên kết glycoside giữa 2 phân tử carbohydrate, một trong những liên kết mạnh nhất

được tìm thấy ở các polymer tự nhiên. Các enzyme này có khả năng bẻ gãy các liên kết glycoside nhanh hơn 10^{17} lần so với phản ứng không có enzyme xúc tác (Yip and Withers, 2004).

Khi thức ăn được hấp thu vào cơ thể thì các carbohydrate trong thức ăn được thủy phân thành những phân tử đường nhỏ hơn bởi những enzyme ở ruột non. Tiến trình phân hóa này đòi hỏi tụy tạng phải tiết ra enzyme α -amylase dùng để phá vỡ các phân tử carbohydrat lớn thành oligosaccharid. Enzyme α -glucosidase ở màng ruột non lại tiếp tục phân hóa các oligosaccharid thành các phân tử đường nhỏ hơn nữa rồi mới thẩm thấu vào máu (Đỗ Quý Hai, 2006; Nguyen and Kim, 2009; Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2009).

2.5.5 Cơ chế sinh học ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các hợp chất có hoạt tính sinh học

Theo Hogan (2009), cơ chế sinh học ức chế α -amylase và α -glucosidase của cao chiết để cải thiện mức đường huyết được thể hiện trong Hình 2.7.



Hình 6: Cơ chế ức chế hai enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao chiết (Hogan, 2009).

Tinh bột bị thủy phân dưới xúc tác của enzyme α -amylase tạo thành các phân tử đường maltose. Sau đó các phân tử đường maltose tiếp tục bị thủy phân bởi

enzyme α -glucosidase tạo thành các phân tử đường glucose làm tăng hàm lượng đường glucose trong máu. Dưới tác động cao chiết sẽ làm ức chế sự thủy phân tinh bột thành đường maltose, đường maltose không bị thủy phân thành các phân tử đường glucose.

2.5.6 Chất ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase

Các chất ức chế 2 enzyme này có ý nghĩa quan trọng trong các lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm,... Các nhà khoa học đã tìm thấy rất nhiều hợp chất trong tự nhiên và trong tổng hợp hóa học có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase. Các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase như: flavonoid (flavone, flavononol, isoflavone), proanthocyanidin, alkaloid, saponin, triterpenoid, phenolic, tanin, dẫn xuất của cinnamic acid,... (Kumar *et al.*, 2011; Sales *et al.*, 2012).

Bảng 1: Các hợp chất tự nhiên ức chế enzyme α -amylase (Sales et al., 2012).

Stt	Nhóm hợp chất	Tên hoạt chất
1	Flavonoid	Quercetin, kaempferol, myricetin, hesperetin, rutin, daidzein, Luteolin, scutellarein, eupafolin
2	Phenolic	Cyanidine, (-)-3-O-galloylepicatechin ... (-)-3-O-galloylepicatechin, (-) – 3-O galloylcatechin, ellagic acid, gallic acid, gentisic acid, caffeic acid, ferulic acid,...
3	Saponin-triterpenoid	Betulinic acid, lupeol, squalene, oleanoic acid, ursolic acid, 3-O-[(9Z)-9exadec-9-enoyl]-amyrin...
4	Tanin	Strictinin, gallotannin, pedunculagin, 1 (α)- galloyl pedunculagin, rubusaviin, lambertianin,...
5	Alkaloid	Mahanimbine,
6	Xanthone Glucoside	Mangiferin, p-cymene, 1,8 – cineole, 1-(S)- α -pinene
7	Acid cinnamic và dẫn xuất	rosmarinic acid, isochlorogenic acid và chlorogenic acid esculin, ...

Bảng 2: Các hợp chất tự nhiên ức chế enzyme α -glucosidase (Kumar et al., 2011).

Stt	Nhóm hợp chất	Tên hoạt chất
1	Flavonoid	Quercetin 3-O- β -d-xylopyranosyl (1" \rightarrow 2")- β -d-galactopyranoside, Luteolin, Apigennin, Hesperetin, (+)-catechin, Cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-galactoside, 2R,3R,4R,5R)2,5-bis(hydroxymethyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine, 1-deoxynojirimycin ...
2	Alcaloid	3b-Acetoxy-16b-hydroxybetulinic acid, acid 28-O- α -l-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -d-fucopyranosyl ester,...
3	Saponin-triterpenoid	3b-Acetoxy-16b-hydroxybetulinic acid, acid 28-O- α -l-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -d-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -d-fucopyranosyl ester, ...
4	Curcuminoid	Curcumim, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin
5	Miscellaneous	Bromophenols, 2,4,6-tribromophenol, 2,4-dibromophenol
6	Phenolic	Chebulanin, chebulagic acid, and chebulinic acid, (-)-3-O-galloylepicatechin, (-)-3-O-galloylcatechin

2.6 Sơ lược về gốc tự do và chất chống oxy hóa

Ở trong cơ thể sống, sự sản sinh ra gốc tự do gần như cân bằng với hệ thống chống oxy hóa. Khái niệm stress oxy hóa dùng để chỉ tình trạng mất cân bằng giữa sự tạo thành gốc tự do với hệ thống chống oxy hóa. Nếu stress oxy hóa ở mức độ nhẹ, các phân tử sinh học bị tổn thương có thể được thay thế hoặc sửa chữa; còn nếu ở mức độ nặng thì có thể gây ra tổn thương hoặc chết tế bào (Lê Thị Thu, 2008).

2.6.1 Gốc tự do

Các gốc tự do là những nguyên tử hay phân tử bị mất đi một điện tử ở lớp vỏ ngoài cùng. Chúng sinh ra liên tục trong quá trình chuyển hóa của cơ thể hoặc hình thành dưới tác động của các yếu tố bên ngoài như ô nhiễm môi trường, stress, rượu

bia,... (Karlsson, 1997). Các gốc tự do hay nói chính xác hơn là các chất hoạt động chứa oxy và nitơ (Reactive Oxygen Species-ROS và Reactive Nitrogen Species-RNS) là các chất dạng khử của oxy và nitơ phân tử. Trong sinh học, các gốc tự do chủ yếu ở dạng oxy hoạt động được hình thành trong quá trình tạo nước của chuỗi hô hấp tế bào, trong quá trình peroxy hóa lipid của các acid béo chưa bão hòa có nhiều liên kết đôi (Lê Thị Thu, 2008). Chúng được chia thành hai nhóm lớn là các gốc tự do và các dẫn xuất không phải gốc tự do (Bảng 2.2). Các gốc tự do là phân tử hoặc nguyên tử có một hoặc nhiều điện tử độc thân. Các dẫn xuất không phải gốc tự do như oxy đơn, hydroperoxide, nitroperoxide là tiền chất của gốc tự do. Các ROS và RNS phản ứng rất nhanh với các phân tử quanh nó, do đó gây tổn thương và làm thay đổi giá trị sinh học của các đại phân tử sinh học như DNA, protein và lipid (Proctor, 1989).

Bảng 3: Các ROS và RNS trong cơ thể sinh học (Proctor, 1989).

ROS/RNS	Ý nghĩa
$O_2^{\cdot-}$	Gốc superoxide
$^{\cdot}OH$	Gốc hydroxyl
ROO^{\cdot}	Gốc peroxide
H_2O_2	Hydrogenperoxide
1O_2	Oxy đơn
NO^{\cdot}	Oxide nitric
$ONO^{\cdot-}$	Peroxynitric
$HOCl$	Hypochlorous acid

2.6.2 Lợi ích của gốc tự do đối với cơ thể

Theo Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu (2009), các ROS và RNS được tạo ra một cách tất yếu trong quá trình trao đổi chất và tùy thuộc vào nồng độ mà tác động tốt hoặc xấu đến cơ thể. Khi số lượng gốc tự do nằm trong khả năng kiểm soát của cơ thể, chúng đóng vai trò rất quan trọng trong các hoạt động sống của cơ thể, các ROS và RNS là các tín hiệu làm nhiệm vụ:

- Điều hòa phân ly tế bào.

- Kích hoạt các yếu tố phiên mã (NFkB, p38MAP kinase,...) cho các gen tham gia quá trình phiên dịch, kháng viêm.

- Điều hòa biểu hiện các gen mã hóa cho các enzyme chống oxy hóa.

2.6.3 Tác hại của gốc tự do đối với cơ thể

Khi cơ thể ở trạng thái khỏe mạnh, cơ thể có khả năng sinh ra các chất chống oxy hóa giúp trung hòa lượng gốc tự do sinh ra trong các quá trình chuyển hóa của cơ thể cũng như các gốc tự do ngoại sinh. Thế nhưng khi bước sang tuổi trung niên hay khi cơ thể không đạt trạng thái khỏe mạnh, cân bằng vốn có giữa gốc tự do và chất chống oxy hóa bị phá vỡ, kéo theo đó là hàng loạt chuỗi phản ứng bất lợi lên các phân tử lipid, protein, nucleic acid của tế bào, dẫn đến hàng loạt các tổn thương và kết quả là sự hoạt động bất thường của các cơ quan. Ở nồng độ cao, các ROS và RNS oxy hóa các đại phân tử sinh học gây nên: đột biến ở DNA; biến tính protein; oxy hóa lipid (Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu, 2009).

Sự phá hủy các đại phân tử sinh học bởi ROS và RNS là nguyên nhân của rất nhiều bệnh nguy hiểm. Sự oxy hóa các LDL (low density lipoprotein) dẫn đến sự hình thành các vạch lipid trên thành mạch máu, giai đoạn đầu tiên của bệnh cao huyết áp và nhiều bệnh tim mạch. Các ROS và RNS tấn công phospholipid màng tế bào làm thay đổi tính mềm dẻo của màng, thay đổi chức năng của nhiều thụ thể trên màng, do đó ảnh hưởng đến tính thẩm thấu của màng cũng như trao đổi thông tin của màng tế bào với môi trường. Sự oxy hóa các DNA bởi ROS và RNS gây nên biến dị di truyền là một trong những nguy cơ phát sinh ung thư. Nhiều enzyme và protein vận chuyển cũng bị oxy hóa và bất hoạt bởi ROS và RNS. Sự tích lũy các sản phẩm của sự oxy hóa các cấu trúc tế bào gây nên hiện tượng lão hóa sớm. Các ROS và RNS cũng tham gia vào các quá trình gây nên bệnh suy giảm hệ thần kinh như Alzheimer, trong đó hiện tượng chết các tế bào thần kinh gắn liền với hiện tượng phân ly tế bào gây nên bởi các ROS và RNS (Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu, 2009). Để bảo vệ cơ thể khỏi tác động xấu của các ROS và RNS, tế bào được trang bị một hệ thống bảo vệ bao gồm các chất chống oxy hóa.

2.6.4 Các chất chống oxy hóa

Các chất chống oxy hóa là các hợp chất có khả năng làm chậm, ngăn cản hoặc đảo ngược quá trình oxy hóa các hợp chất có trong tế bào của cơ thể (Jovanovic and

Simic, 2000; Singh and Rajini, 2004). Dựa trên nguyên tắc hoạt động, các chất chống oxy hóa được phân thành 2 loại:

(i) Các chất chống oxy hóa bậc một khử hoặc kết hợp với các gốc tự do, làm kìm hãm pha khởi phát hoặc bẻ gãy dây chuyền phản ứng của quá trình oxy hóa.

(ii) Các chất chống oxy hóa bậc hai làm kìm hãm sự tạo thành các gốc tự do (hấp thu các tia cực tím; tạo phức với các kim loại kích thích sự tạo thành các gốc tự do Fe, Cu; bất hoạt oxy đơn) (Singh and Rajini, 2004).

Hệ thống các chất oxy hóa của cơ thể được cung cấp bởi hai nguồn: nội sinh, ngoại sinh.

- Các chất chống oxy hóa nội sinh bao gồm các protein (ferritine, transferrine, albumine, protein sốc nhiệt) và các enzyme chống oxy hóa (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase).

- Các chất chống oxy hóa ngoại sinh là những cấu tử nhỏ được đưa vào cơ thể bao gồm vitamin C, các carotenoid và các hợp chất phenolic (Niki et al., 1995; Lachman et al., 2000; Vansant et al., 2004).

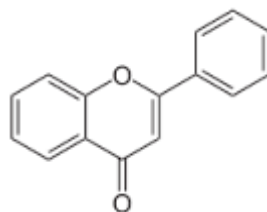
Các hợp chất phenol: là một trong các nhóm sản phẩm trao đổi chất bậc hai chủ yếu của thực vật, rất đa dạng về cấu trúc và chức năng. Ở thực vật, các hợp chất phenol tạo màu cho thực vật (anthocyanin); bảo vệ thực vật trước tia cực tím, chống lại sự oxy hóa; là các hợp chất tín hiệu giữa thực vật và vi khuẩn nốt sần; bảo vệ thực vật trước sự tấn công của vi sinh vật gây hại (như vi khuẩn gây thối rữa ở khoai tây); là vật liệu góp phần vào độ bền thực vật và sự thẩm thấu của thành tế bào đối với nước và khí (Al-Saikhan et al., 1995; Chirinos et al., 2007).

Cơ chế hoạt động chống oxy hóa của các hợp chất phenol như sau:

- Khử và bất hoạt các gốc tự do nhờ cơ chế oxy hóa khử thấp.
- Tạo phức với ion Fe^{2+} và Cu^{2+} .
- Kìm hãm hoạt động của các enzyme có khả năng tạo các gốc tự do như enzyme xanthine oxidase.

Các hợp chất flavonoid: có thể khử các gốc tự do như peroxy, alkoxyl và hydroxyl bằng cách nhường nguyên tử hydro (Jovanovic and Simic, 2000) (Hình

2.8). Gốc flavonoid tự do sau đó lại kết hợp với một gốc tự do khác để tạo thành hợp chất bền.



Hình 7: Flavonoid

Vitamin C: có khả năng bất hoạt các gốc tự do rất tốt do có thể chuyển các gốc tự do hai nguyên tử hydro của nó và khi đó trở thành dehydroascorbic acid. Ngoài khả năng bất hoạt trực tiếp các gốc tự do, vitamin C còn có khả năng hoạt động hiệp lực với các chất chống oxy hóa khác trong cơ thể như các gốc tocopheryl của carotenoid và flavonoid được khử thành dạng hoạt động tocopherol nhờ nhận được hydro từ vitamin C (Jovanovic và Simic, 2000; Burke *et al.*, 2001).

2.6.5 Stress oxy hóa và hậu quả của nó ở bệnh đái tháo đường

Trong bệnh ĐTD, nồng độ glucose máu tăng cao và kéo dài gây hàng loạt rối loạn chuyển hóa ở những tế bào mà sự hấp thu glucose không phụ thuộc insulin (như tế bào nội mạc mạch máu, võng mạc, thận và một số cấu trúc thuộc hệ thần kinh) dẫn đến tình trạng stress oxy hóa. Hậu quả của stress oxy hóa là rối loạn chức năng thành mạch, tổn thương lớp tế bào nội mạc, tạo mảng xơ vữa, gây ra bệnh lý mạch máu, là nguyên nhân hầu hết các biến chứng mãn tính của bệnh ĐTD (Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu, 2009).

Theo Duman *et al.* (2003), Ozdemir *et al.* (2005) và Colak *et al.* (2005) cho rằng, stress oxy hóa và suy giảm hệ thống chống oxy hóa là đặc trưng ở bệnh ĐTD type 2 và xuất hiện rất sớm, trước khi có biến chứng. Việc bổ sung vitamin E và vitamin C cải thiện được chức năng thận và có tác dụng làm giảm nguy cơ bệnh tim mạch ở bệnh nhân ĐTD type 2 (Jeanette, 2005).

2.7 Tình hình nghiên cứu khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase trong và ngoài nước

2.7.1 Trên Thế giới

Trên Thế giới có nhiều nghiên cứu điều trị bệnh tiểu đường từ nguồn gốc thảo dược như: nghiên cứu của Hsieh et al. (2009) cho thấy cao chiết nước từ cây *Flemingia macrophylla* có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase and aldose reductase với giá trị IC_{50} lần lượt là $153,92 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ and $79,36 \pm 3,20 \mu\text{g/mL}$; cây thuốc *Leptadenia hastata* (Pers.) decne ở Châu Phi có khả năng ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase lần lượt là 69,81% and 37,02% đối với dịch trích từ methanol và nước (Bello et al., 2011); cao chiết ethanol từ lá *Orthosiphon stamineus* có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 36,70 mg/ml và 4.63 mg/ml (Elsnoussi et al., 2012),. Cao chiết từ thân của cây *Acacia nilotica* có khả năng ức chế α -glucosidase and aldose reductase với giá trị IC_{50} lần lượt là 8 $\mu\text{g/mL}$ và 7,5 $\mu\text{g/mL}$ (Natasha et al., 2012); cao chiết methanol từ lá của cây *Psidium guajava* cho thấy có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase với khả năng ức chế là 96,3% và 89,4% (Manikandan et al., 2013); lá cây *Picralima nitida* (Stapf) được trích bằng acetone có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 6,5 mg/mL và 3,0 mg/mL, lá cây *Morinda lucida* Benth (Nigeria), dịch trích nước có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC_{50} tương ứng là 2,3 mg/mL và 2,0 mg/mL (Mutiu et al., 2013); dịch trích ethanol từ trái *Terminallia capptapa* L có khả năng ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} là 3,02 ppm (Abdul et al., 2013); dịch trích của lá cây thuốc lá có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 5,70 mg/mL và 4,50 mg/mL (Mutiu et al., 2014); cao chiết từ vỏ của trái chôm chôm có khả năng ức chế hoạt động của hai enzyme α -amylase và α -glucosidase với ức chế là 97,3% và 96,66% (Aree et al. , 2014); Cao chiết từ lá măng cầu ta có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase (Kumar et al., 2011). Ngoài ra, còn tìm thấy hai hợp chất có khả năng chống được viêm loét ở quả măng cầu ta là 5 - ((6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) methyl) -2-methoxybenzene-1,3-diol và (1R, 3S) -6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1,3-diol (Jayendra et al., 2013); cây mướp đắng được sử dụng không chỉ như một loại rau mà còn được sử dụng trong y học cổ truyền để phòng chống ĐTĐ và nhiều nghiên cứu thử nghiệm trên động vật và trên người cho kết quả có tác dụng kiểm soát glucose máu. Dịch chiết từ quả, hạt hoặc lá cây mướp đắng đều làm giảm glucose máu lúc đói, cải thiện

dung nạp glucose máu trên chuột khỏe mạnh, chuột ĐTĐ, người khỏe mạnh và bệnh nhân ĐTĐ type 2 (Miura et al., 2001; Ooi et al., 2010; Raman et al., 1996; Wang et al., 1991); nghiên cứu của Deguchi Y và ctv (2010) đánh giá khả năng kiểm soát glucose máu sau ăn trên đối tượng người khỏe mạnh hoặc tiền ĐTĐ cho thấy những người tham gia uống trà lá ổi sau khi ăn một bữa ăn cho thấy mức đường máu sau ăn 30, 60, 120 phút giảm hơn so với những người tham gia chỉ uống nước sau khi ăn một bữa ăn.

2.7.2 Ở Việt Nam

Nhiều nghiên cứu đã được công bố về quá trình điều trị bệnh đái tháo đường từ thảo dược có nguồn gốc tự nhiên như: Cao chiết Khổ qua – Đậu bắp (liều uống 60g/kg/ngày) có tác dụng giảm khoảng 40% glucose trên chuột nhắt trắng tăng đường huyết (Nguyễn Thị Nguyên Sinh và Nguyễn Phương Dung, 2010), cây nhàu của Đái Thị Xuân Trang và ctv. (2012) cho thấy, cao chiết cây nhàu với liều lượng 200mg/kg×2 lần/ ngày làm giảm đường huyết tương đương nhóm chuột đái tháo đường được điều trị với thuốc trị đái tháo đường. Cao ethanol lá ổi được sử dụng liều 400 mg/kg cho chuột đái tháo đường, kết quả chứng minh rằng cao ethanol lá ổi có khả năng hạ đường huyết tương đương với thuốc điều trị đái tháo đường gliclazide (Đái Thị Xuân Trang và ctv., 2012). Ngoài ra, cao Vùng quả xoan làm giảm nồng độ đường huyết của chuột sau 15 ngày dùng đường uống liều 2g/kg/ngày kết quả tương đương với 30mg/kg Acarbose (Nguyễn Trần Châu và ctv., 2012). Theo Hà Bích Ngọc (2012), nghiên cứu một số thực vật Việt Nam có tác dụng hỗ trợ điều hòa lượng đường trong máu để ứng dụng cho bệnh nhân đái tháo đường type 2 dựa trên cơ chế ức chế enzyme α -glucosidase; tác dụng hạ glucose máu và ảnh hưởng chuyển hóa glucose từ dịch chiết lá bằng lắng nước trên chuột nhắt trắng và chuột ĐTĐ, cho thấy cây bằng lăng nước có hoạt chất chính là polyphenol và acid corosolic có tác dụng ức chế men α -glucosidase kiểm soát glucose máu sau ăn (Phùng Thanh Hương, 2010); cao lá Dâu ở liều uống 300 mg/kg/24 giờ sau 42 ngày có tác dụng giảm 43% đường huyết trên thỏ trắng tăng đường huyết do streptozocin và tốt hơn gliclazide liều 15 mg/kg/24 giờ (Nguyễn Văn Ba và Phạm Xuân Phong, 2014).

3. Mục tiêu của đề tài

Đánh giá khả năng ức chế enzyme α -amylase, α -glucosidase và khử gốc tự do bằng phương pháp DPPH từ cao chiết của một số cây thuốc dân gian có khả năng điều trị bệnh đái tháo đường, làm cơ sở cho quá trình nghiên cứu và sản xuất dược phẩm từ những cây thuốc dân gian sẵn có tại tỉnh Trà Vinh.

4 Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu

4.1 Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

Đề tài được thực hiện khảo sát các chất có hoạt tính sinh học trong lá măng cầu xiêm, lá măng cầu ta, lá xoài và lá ổi tại các huyện trong tỉnh Trà Vinh.

4.2 Phương pháp nghiên cứu

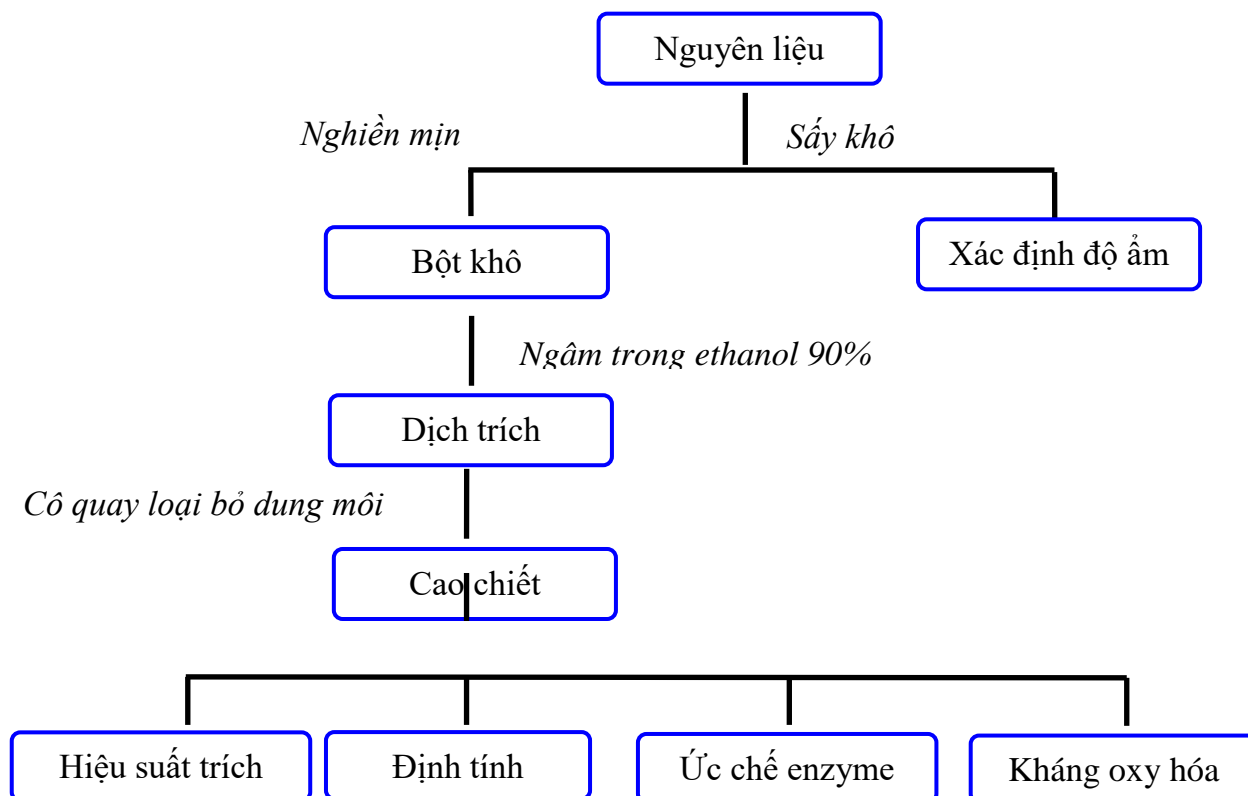
Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm Stagraphics plus 16. Kiểm tra sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bằng phép thử LSD và Duncan.

NỘI DUNG

CHƯƠNG I

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ ĐẾN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α -AMYLASE

Sơ đồ bố trí tổng quát nghiên cứu được trình bày trong Hình 8.



Hình 8: Sơ đồ bố trí tổng quát thí nghiệm.

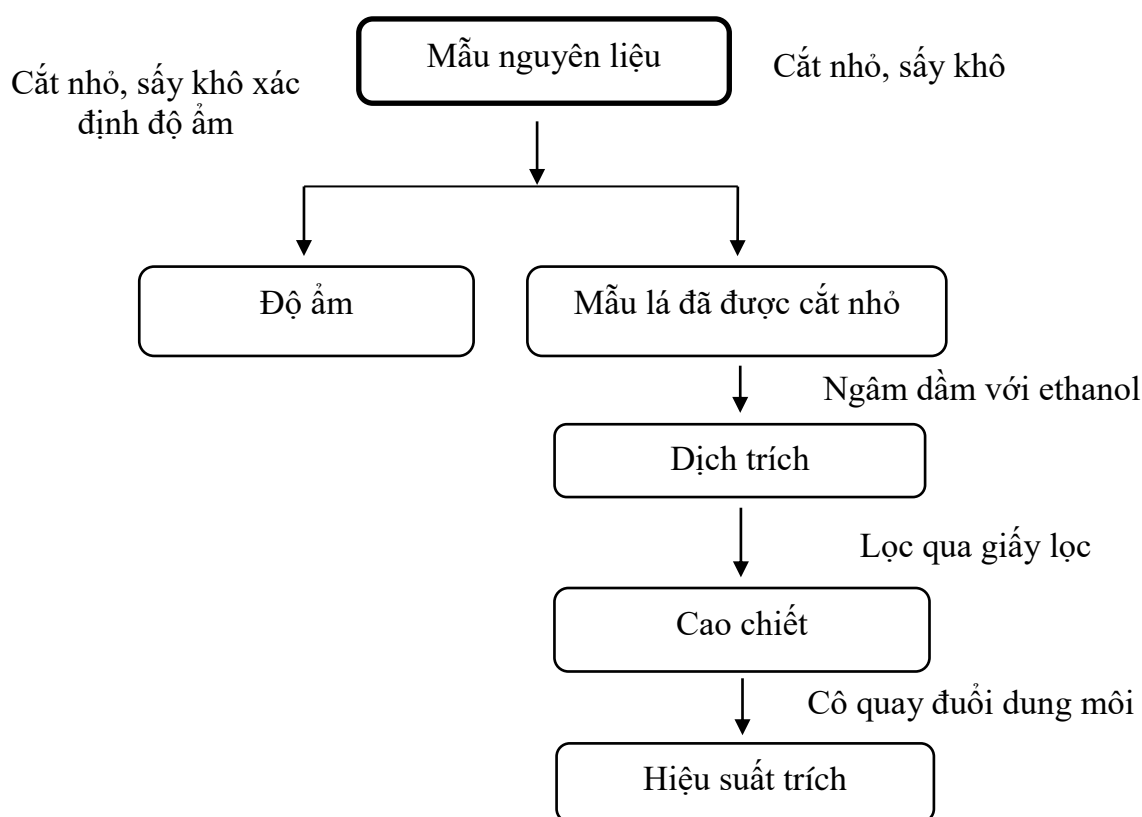
Nguyên liệu: các mẫu lá (mãng cầu Xiêm, mãng cầu Ta, Bình bát, Xoài và Ổi) tươi xanh, sạch bệnh sau khi thu từ nhà vườn mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch, lau khô và bỏ phần cuống trái. Sau đó, các mẫu lá được cắt nhỏ thành các phần đều nhau và sấy ở điều kiện nhiệt độ 50°C, trong 72 giờ.

Dung môi: chuẩn bị dung môi ethanol 90% cho quá trình ngâm dầm.

Tiến hành thí nghiệm: các mẫu lá sau khi sấy được cho vào túi vải, buộc kỹ, thực hiện ngâm dầm với ethanol 90%, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:10 (w/v). Tiến hành ngâm dầm các mẫu lá trong bình thủy tinh 10 lít, trong điều kiện nhiệt độ phòng, để trong tối và thời gian ngâm là 72 giờ. Sau đó, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc có đường kính 13 μ m, thu dịch lọc và bỏ phần bã. Dịch lọc được cô cạn

bằng máy cô quay chân không để loại bỏ dung môi và thu được cao ethanol của các mẫu lá. Cao chiết ethanol của các mẫu lá được trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ -20°C và sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Sơ đồ bố trí tiến hành thí nghiệm trích cao ethanol của các mẫu lá được trình bày trong Hình 9.



Hình 9: Sơ đồ tóm tắt quy trình trích cao của các mẫu lá.

Chỉ tiêu theo dõi: độ ẩm nguyên liệu và hiệu suất trích.

a/ Độ ẩm nguyên liệu: Độ ẩm là lượng nước tự do có trong nguyên liệu. Biết được độ ẩm là một điều quan trọng trong công tác phân tích xác định giá trị dinh dưỡng và chất lượng nguyên liệu (Trần Hùng, 2012).

Nguyên tắc: Dùng sức nóng làm bay hết hơi nước trong mẫu nguyên liệu. Cân trọng lượng mẫu trước và sau khi sấy khô, từ đó tính ra phần trăm nước có trong mẫu nguyên liệu.

Tiến hành: Cân khoảng 1 g mẫu và ghi nhận một khối lượng mẫu chính xác, sau đó sấy ở 105°C . Sau khi sấy 4 giờ, mẫu được lấy ra và làm nguội trong bình hút

ẩm, cân sau khi đã nguội, tiếp tục lặp lại quá trình này sau mỗi 1 giờ đến khi khối lượng mẫu cân được không thay đổi. Tiến hành 3 lần lặp lại mẫu phân tích. Kết quả độ ẩm được tính trung bình của các lần lặp lại đó.

Tính toán kết quả: Độ ẩm (X) quy về phần trăm được tính theo công thức:

$$X = \frac{m_t - m_k}{m_t} \times 100\%$$

Trong đó: m_k : Khối lượng mẫu (đã trừ khối lượng dụng cụ chứa mẫu) sau khi sấy khô đến khối lượng không đổi (g).

m_t : Khối lượng mẫu tươi (đã trừ khối lượng dụng cụ chứa mẫu) trước khi sấy (g).

b/ Hiệu suất trích: Hiệu suất trích H quy về % được tính theo công thức:

$$H = \frac{m_c}{m_b} \times 100\%$$

Trong đó: H: hiệu suất trích (%).

m_b : khối lượng bột trước khi ngâm (g);

m_c : khối lượng cao chiết sau khi cô quay (g).

Mục tiêu: xác định nồng độ cao chiết ethanol của các mẫu lá thích hợp ức chế hoạt động của enzyme α -amylase.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, gồm 5 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại:

Nghiệm thức 1: Nồng độ cao chiết là 20 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 2: Nồng độ cao chiết là 40 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 3: Nồng độ cao chiết là 60 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 4: Nồng độ cao chiết là 80 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 5: Nồng độ cao chiết là 100 $\mu\text{g/mL}$.

Đối chứng dương là Acarbose có 6 mức nồng độ 40, 60, 80, 100 và 120 ($\mu\text{g/mL}$) và thực hiện tương tự cao chiết. Mẫu tinh bột ban đầu không chứa cao chiết và enzyme α -amylase. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được trình bày trong Bảng 3.1

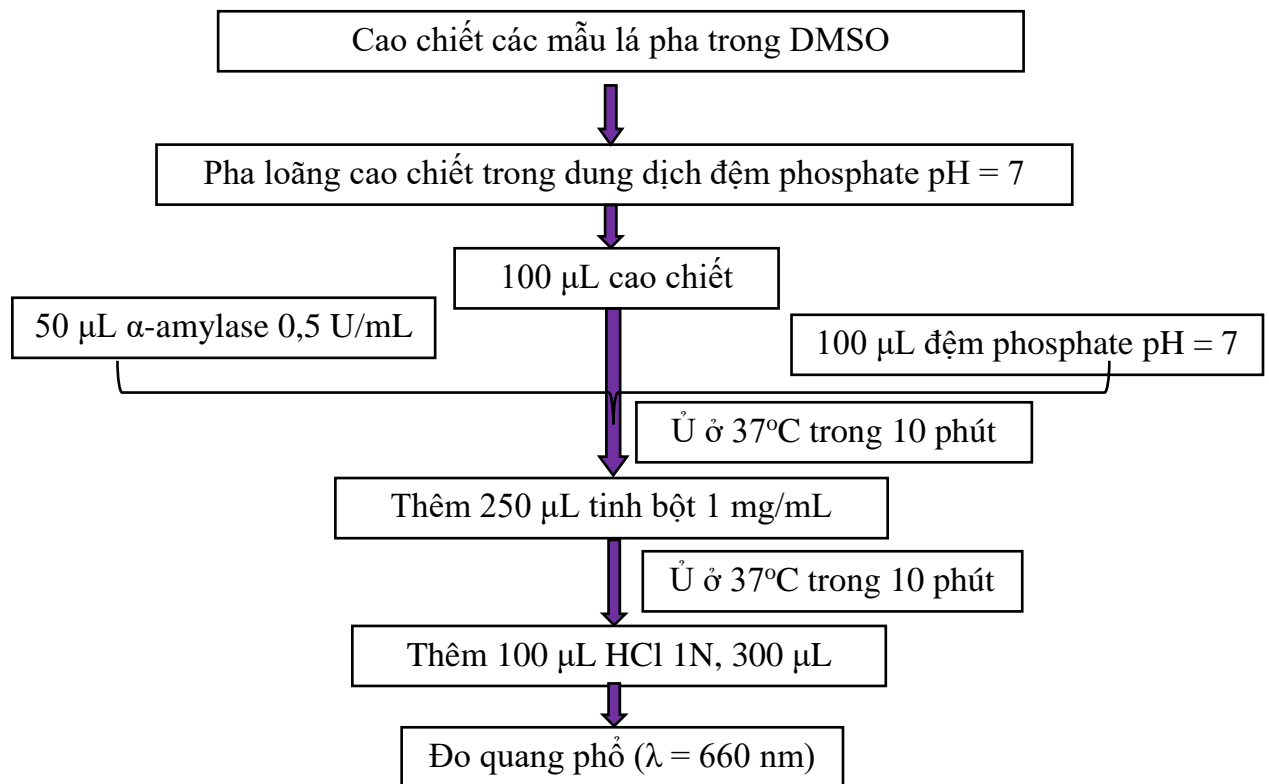
Bảng 4: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -amylase.

Nghiệm thức	Cao chiết (mg/mL)	Acarbose ($\mu\text{g/mL}$)	α - amylase (U/mL)	Tinh bột (mg/mL)	HCl (N)	Iodine (N)
1	0	0	0,5	1	1	0,1
2	20	20	0,5	1	1	0,1
3	40	40	0,5	1	1	0,1
4	60	60	0,5	1	1	0,1
5	80	80	0,5	1	1	0,1
6	100	100	0,5	1	1	0,1

Tiến hành thí nghiệm: Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của enzyme α -amylase được thực hiện theo phương pháp của Akkarachiyasit et al. (2010) và Đái Thị Xuân Trang và ctv. (2012) có điều chỉnh như sau: Cao ethanol các mẫu lá được pha trong dung dịch DMSO thành nồng độ 50 mg/mL (sử dụng DMSO để hòa tan

các chất phân cực có trong cao chiết vì DMSO là dung môi phân cực aprotic), hỗn hợp được vortex và lọc qua giấy lọc có đường kính 13 μm . Pha loãng phần dịch trích thu được trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 thành các mức nồng độ: 20, 40, 60, 80 và 100 ($\mu\text{g/mL}$). Enzyme α -amylase được pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 ở nồng độ 0,5 U/mL. Tinh bột được pha trong nước cất thành nồng độ 1 mg/mL.

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



Hình 10: Quy trình khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase.

Chỉ tiêu đánh giá: Phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế (%) và giá trị IC_{50} .

Phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế (%): Dựa vào lượng tinh bột ban đầu và lượng tinh bột còn lại sau phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thu quang phổ.

Phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế (%) = $100 - \text{Hiệu suất phản ứng (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$

$$\text{Hiệu suất phản ứng (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Trong đó: A_0 : Giá trị quang của dung dịch đối chứng (lượng tinh bột ban đầu).

A_1 : Giá trị quang của dung dịch sau phản ứng (lượng tinh bột còn lại).

Tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa % enzyme bị ức chế và nồng độ mẫu. Dựa vào phương trình đường chuẩn xác định được giá trị IC_{50} (mức nồng độ có khả năng ức chế 50% enzyme).

*** IC_{50} và cách xác định**

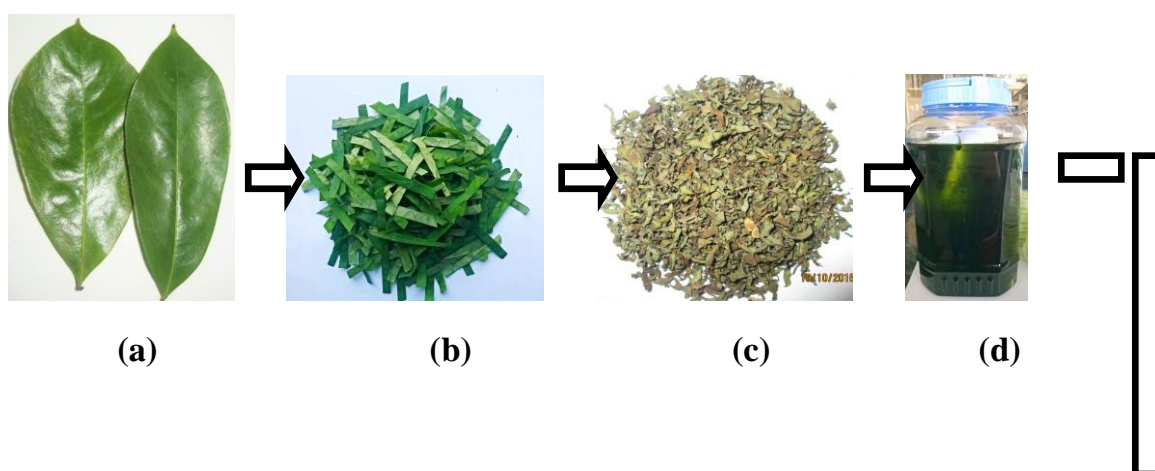
Định nghĩa: IC_{50} là một giá trị dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hoặc yếu của mẫu khảo sát. IC_{50} được định nghĩa là nồng độ (mg/mL) của mẫu tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do, tế bào hoặc enzyme, mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC_{50} sẽ càng thấp.

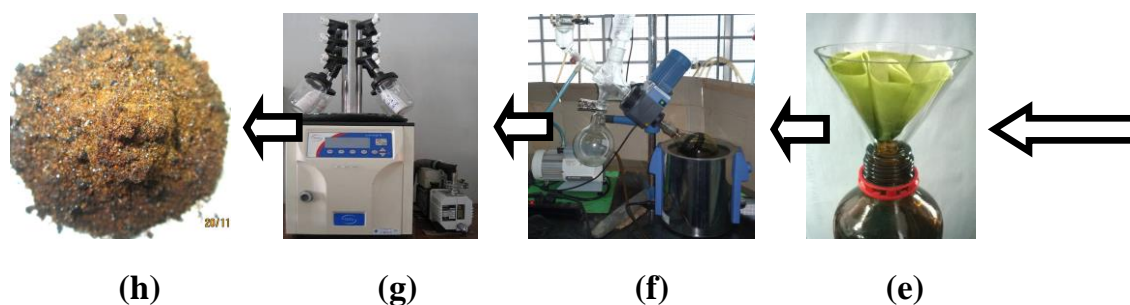
Xác định IC_{50}

Tiến hành khảo sát hoạt tính của mẫu ở nhiều nồng độ khác nhau.

Với những mẫu có hoạt tính biến thiên tuyến tính với nồng độ cao chiết và chúng ta vẽ một đường thẳng $y = ax + b$ qua tất cả các điểm (với y là % ức chế và x là nồng độ). Với những mẫu có hoạt tính không biến thiên tuyến tính với nồng độ, một cách gần đúng, chúng ta chọn hai nồng độ ức chế trên và dưới 50% và cũng tiến hành vẽ đường thẳng $y = ax + b$. Ta sẽ thu được phương trình $y = ax + b$ với hệ số a, b đã biết. Từ phương trình $y = ax + b$ đã biết, thay $y = 50\%$ vào phương trình ta sẽ thu được giá trị x , đó chính là nồng độ ức chế được 50% gốc tự do (IC_{50}).

Quá trình trích cao chiết của các mẫu lá được tiến hành với nguồn nguyên liệu ban đầu là 1500 g mẫu của các mẫu lá sau sấy ở nhiệt độ $50^{\circ}C$ trong 72 giờ. Các mẫu lá được ngâm dầm trong ethanol 90% với tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:10 (w/v) trong 72 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng, trong tối. Sau đó, hỗn hợp ngâm dầm được lọc qua giấy lọc với đường kính $13\ \mu m$, thu phần dịch lọc và bỏ phần bã. Tiến hành cô dịch lọc bằng máy cô quay chân không để loại bỏ dung môi ethanol và thu cao chiết ethanol của các mẫu lá (Hình 11). Mẫu cao chiết ethanol của các mẫu lá được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ $-20^{\circ}C$ và để sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.





Hình 11. Quá trình chiết cao ethanol.

Ghi chú: (a): Mẫu lá tươi; (b): Mẫu lá cắt nhỏ;
 (c): Mẫu lá sau sấy; (d): Bình mẫu ngâm đậm;
 (e): Lọc dịch trích mẫu; (f): Mẫu cô quay;
 (g): Mẫu đông khô chân không; (h): Cao chiết ethanol.

Việc xác định độ ẩm của các mẫu lá trước khi tiến hành ly trích giúp biết được các điều kiện để xác định phương pháp ly trích phù hợp nhằm thu được lượng cao chiết tối ưu. Ngoài ra, việc xác định độ ẩm của nguyên liệu còn tạo điều kiện để xác định nhiệt độ và thời gian sấy mẫu để tiến hành ly trích có hiệu suất cao hơn (Viện Dược liệu, 2008). Theo Dương Thị Phụng Liên và Nguyễn Nhật Minh Phương (2014), trong suốt quá trình sấy mẫu, nhiệt độ cao làm phá vỡ các cấu trúc tế bào bên trong của nguyên liệu tạo điều kiện cho dung môi và nguyên liệu tiếp xúc tốt hơn, tăng khả năng ly trích. Bên cạnh đó, quá trình sấy còn có tác dụng làm giảm độ ẩm của nguyên liệu giúp tăng tỷ lệ dung môi sử dụng với nguyên liệu. Kết quả phân tích cho thấy, độ ẩm của các mẫu lá tương đối cao, cao nhất là mẫu lá ổi đạt 66,33%, kế đến là mẫu lá bình bát và măng cầu ta đạt lần lượt là 56,67 và 55,26; giữa mẫu lá măng cầu Xiêm và Xoài có độ ẩm tương đương nhau (30-31%) (Bảng 5).

Bảng 5: Kết quả độ ẩm và hiệu suất trích cao ethanol của các mẫu lá.

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả				
	Lá măng cầu Xiêm	Lá măng cầu Ta	Lá Bình bát	Lá Xoài	Lá Ổi
Độ ẩm (%)	30,00	55,26	56,67	30,91	66,33
Khối lượng mẫu lá (g)	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
Khối lượng cao thô (g)	132,1	80,5	72,1	124,3	54,3

Hiệu suất chiết (%)	8,8	5,4	4,8	8,3	3,6
---------------------	-----	-----	-----	-----	-----

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp trích cao, người ta thường dựa trên hiệu suất trích cao. Hiệu suất trích cao phản ánh sự tối ưu của việc kết hợp các điều kiện khác nhau trong phương pháp ly trích. Với nguyên liệu ban đầu cho quá trình trích cao là 1,5 kg các mẫu lá nguyên liệu, khối lượng cao khô thu được sau khi cô quay đuổi dung môi ethanol của các mẫu lá nguyên liệu có sự khác nhau. Cao nhất là mẫu lá măng cầu Xiêm với khối lượng cao chiết là 132,1 g và hiệu suất cao trích đạt 8,8%; tiếp đến là mẫu lá Xoài đạt 124,3 g cao chiết và hiệu suất cao trích đạt 8,3%; mẫu lá măng cầu Ta đạt 80,5 g cao chiết và hiệu suất cao trích đạt 5,4%; mẫu lá Bình bát có hiệu suất cao trích đạt 4,8% (72,1 g) và thấp nhất là mẫu lá Ôi với khối lượng cao chiết là 54,3 g và hiệu suất cao trích đạt 3,6% (Bảng 5).

CHƯƠNG 2

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ ĐẾN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α - GLUCOSIDASE

Mục tiêu: xác định nồng độ cao chiết ethanol của các mẫu lá thích hợp ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, gồm 5 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại:

Nghiệm thức 1: Nồng độ cao chiết là 10 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 2: Nồng độ cao chiết là 25 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 3: Nồng độ cao chiết là 50 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 4: Nồng độ cao chiết là 75 $\mu\text{g/mL}$.

Nghiệm thức 5: Nồng độ cao chiết là 100 $\mu\text{g/mL}$.

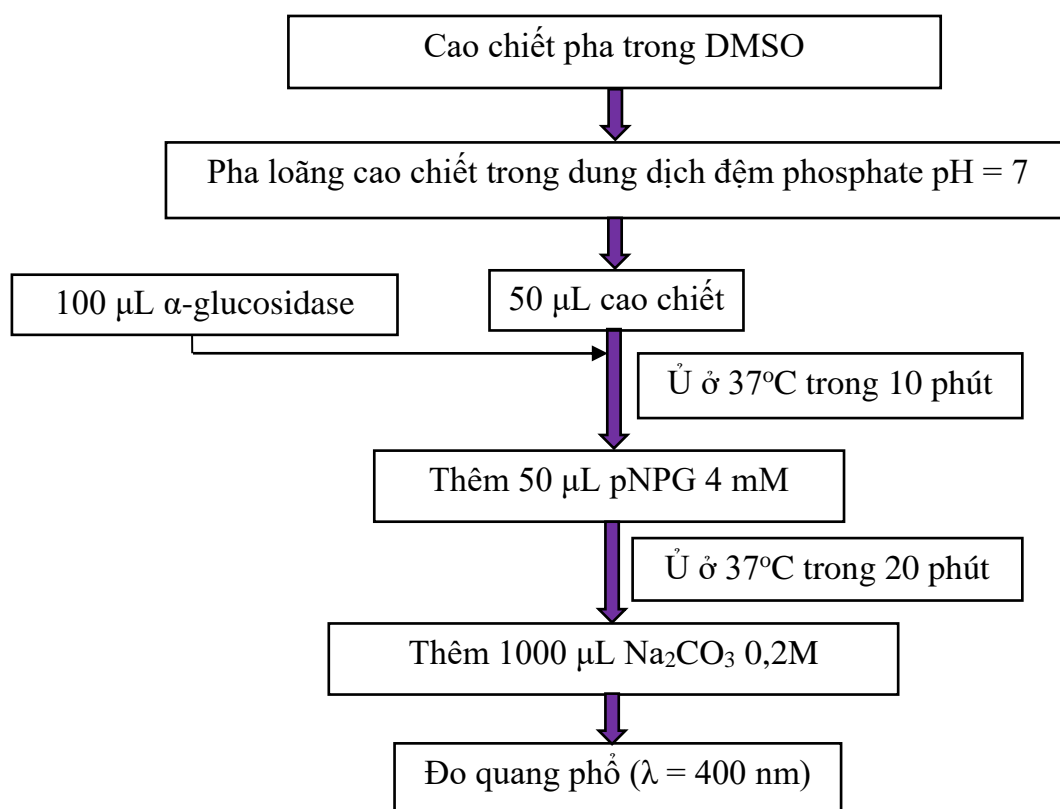
Đối chứng dương là Acarbose có 5 mức nồng độ là 40, 60, 80, 100, 120 ($\mu\text{g/mL}$) và được thực hiện tương tự cao chiết. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết ethanol từ các mẫu lá đến khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.

Nghiệm thức	Cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Acarbose ($\mu\text{g/mL}$)	α -glucosidase (U/mL)	pNPG (mM)	Na_2CO_3 (M)
1	10	40	0,2	4	0,2
2	25	60	0,2	4	0,2
3	50	80	0,2	4	0,2
4	75	100	0,2	4	0,2
5	100	120	0,2	4	0,2

Tiến hành thí nghiệm: Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của enzyme α -glucosidase được thực hiện theo phương pháp của Hogan et al. (2010) và Đái Thị Xuân Trang và ctv. (2012) và có điều chỉnh như sau: Cao ethanol từ các mẫu lá được pha trong dung dịch DMSO thành nồng độ 1 mg/mL, hỗn hợp được ly tâm 10 phút. Pha loãng phần dịch trích thu được trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 thành các mức nồng độ: 10, 25, 50, 75 và 100 (μ g/mL). Enzyme α -glucosidase được pha trong dung dịch đệm phosphate pH = 7 thành nồng độ 0,2 U/mL.

100 μ L enzyme α -glucosidase được ủ với 50 μ L cao chiết ở các mức nồng độ khác nhau ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Tiếp theo, cho vào hỗn hợp phản ứng 50 μ L pNPG nồng độ 4mM. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C với khoảng thời gian 20 phút. Sau cùng, phản ứng được kết thúc bằng việc bổ sung 1000 μ L Na_2CO_3 0,2M. Hoạt động ức chế của enzyme α -glucosidase được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng $\lambda = 400$ nm của lượng *p*-nitrophenol tạo thành từ pNPG trong phản ứng. Song song, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase với đối chứng dương là Acarbose ở các mức nồng độ tương ứng (Hình 12).



Hình 12: Quy trình khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase.

Chỉ tiêu đánh giá: Phần trăm enzyme α -glucosidase bị ức chế (%) và giá trị IC_{50} . Phần trăm enzyme α -glucosidase bị ức chế (%) được tính dựa vào lượng *p*-nitrophenol tạo thành từ pNPG trong phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thu quang phổ.

B - A

Phần trăm enzyme α -glucosidase bị ức chế (%) = ----- x 100

B

Trong đó: A: Giá trị quang của mẫu thật.

B: Giá trị quang của mẫu đối chứng.

Các chất ức chế (Acarbose, Tannin) có tác động mạnh đến khả năng hoạt động của enzyme α -amylase bằng cách kìm hãm theo hướng cạnh tranh hay phi cạnh tranh, kết quả làm ảnh hưởng đến sự liên kết giữa trung tâm hoạt động của enzyme với cơ chất (Kandra, 2004; Cheng, 2005 và Lê Thanh Hải, 2013). Vì vậy, Acarbose được sử dụng như nghiệm thức đối chứng trong các thí nghiệm khảo sát khả năng

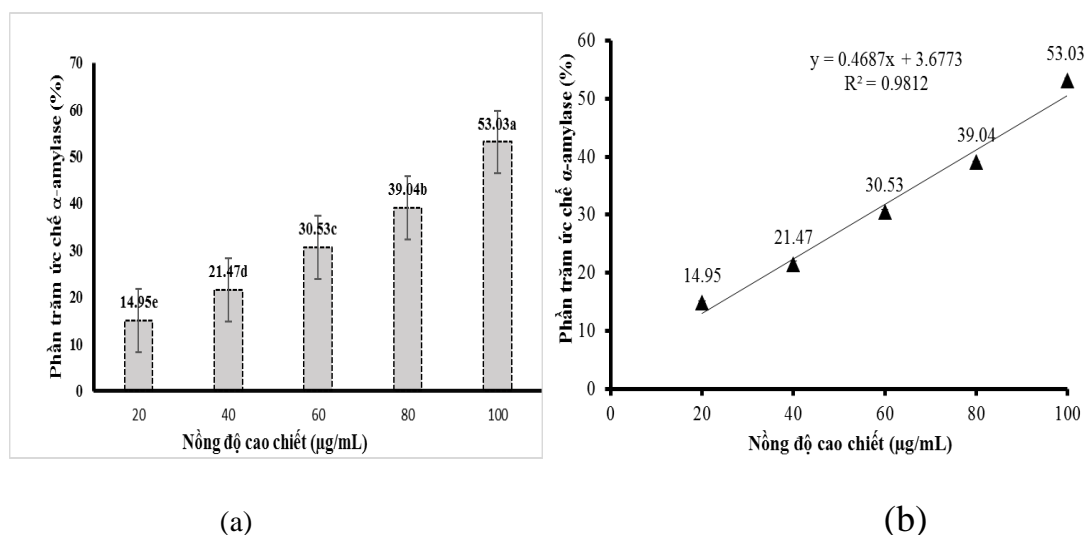
ức chế enzyme α -amylase. Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase của Acarbose được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase của Acarbose.

Nồng độ Acarbose ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế α -amylase (%)
20	$14,95^e \pm 0,25$
40	$21,47^d \pm 0,74$
60	$30,53^c \pm 0,51$
80	$39,04^b \pm 0,20$
100	$53,03^a \pm 0,61$

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.

Kết quả phân tích cho thấy, khi tăng nồng độ Acarbose từ 20-100 ($\mu\text{g/mL}$), phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ Acarbose và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% giữa các nồng độ. Cụ thể, ở nồng độ Acarbose 100 $\mu\text{g/mL}$, khả năng ức chế enzyme α -amylase đạt 53,03% và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Khi tăng nồng độ Acarbose lên 20, 40, 60, 80, 100 ($\mu\text{g/mL}$), khả năng ức chế enzyme α -amylase cũng tăng lần lượt là 14,95; 21,47; 30,53; 39,04; 53,03 % (Hình 13a).



Hình 13: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của Acarbose.

Dựa vào kết quả phân tích khả năng ức chế enzyme α -amylase của Acarbose, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α -amylase của Acarbose giữa các nồng độ khác nhau. Kết quả vẽ được phương trình đường thẳng $y =$

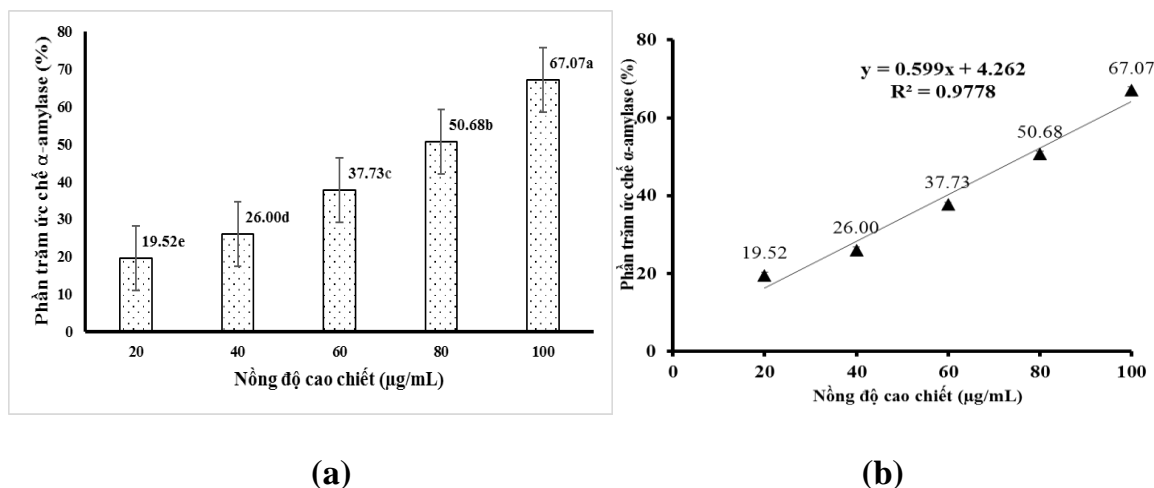
$0,4687x + 3,6773$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9812$ (Hình 13b). Dựa vào phương trình này, giá trị IC_{50} của Acarbose là $98,83 \mu\text{g/mL}$.

Bảng 8: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá.

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế α -amylase (%)				
	Lá măng cầu Xiêm	Lá măng cầu Ta	Lá Bình bát	Lá Xoài	Lá Ổi
20	$19,52^{\text{e}} \pm 0,29$	$15,49^{\text{e}} \pm 0,36$	$24,77^{\text{e}} \pm 0,40$	$30,52^{\text{e}} \pm 0,43$	$34,88^{\text{e}} \pm 0,35$
40	$26,00^{\text{d}} \pm 0,35$	$26,77^{\text{d}} \pm 0,29$	$29,36^{\text{d}} \pm 0,54$	$36,92^{\text{d}} \pm 1,85$	$43,70^{\text{d}} \pm 0,57$
60	$37,73^{\text{c}} \pm 0,20$	$51,31^{\text{c}} \pm 0,22$	$35,08^{\text{c}} \pm 0,42$	$47,19^{\text{c}} \pm 1,25$	$65,41^{\text{c}} \pm 1,30$
80	$50,68^{\text{b}} \pm 0,30$	$59,19^{\text{b}} \pm 0,37$	$46,12^{\text{b}} \pm 0,69$	$53,59^{\text{b}} \pm 1,33$	$78,10^{\text{b}} \pm 1,00$
100	$67,07^{\text{a}} \pm 0,39$	$78,13^{\text{a}} \pm 0,21$	$56,20^{\text{a}} \pm 0,70$	$67,73^{\text{a}} \pm 0,09$	$87,11^{\text{a}} \pm 0,17$

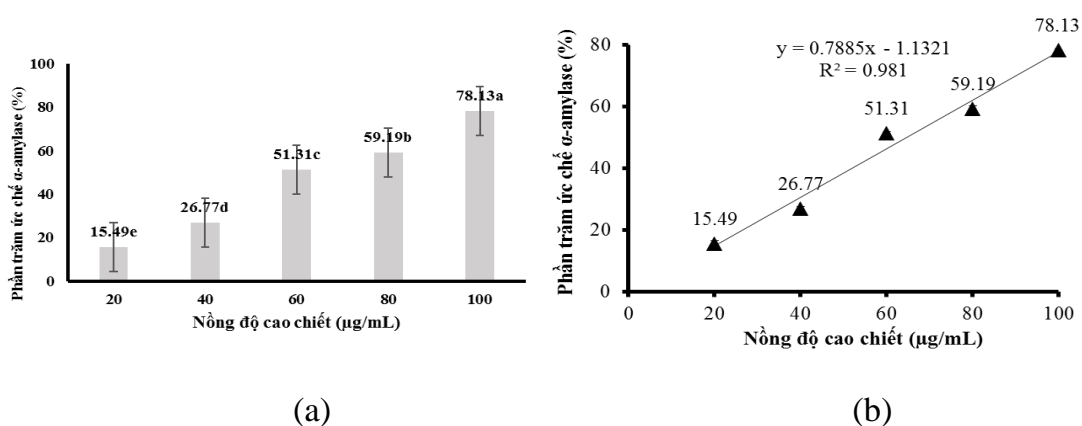
Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.

Kết quả phân tích cho thấy, khi tăng nồng độ cao chiết lá măng cầu xiêm từ 20-100 ($\mu\text{g/mL}$), phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ cao chiết và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% giữa các nồng độ. Cụ thể, ở nồng độ cao chiết 100 $\mu\text{g/mL}$, khả năng ức chế enzyme α -amylase đạt 67,07% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Khi tăng nồng độ cao chiết lên 20, 40, 60, 80, 100 ($\mu\text{g/mL}$), khả năng ức chế enzyme α -amylase cũng tăng lần lượt là 19,52; 26,00; 37,73; 50,68 và 76,07% (Hình 4.3a) và vẽ được phương trình $y = 0,599x + 4,262$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9778$ với giá trị IC_{50} của cao chiết lá măng cầu xiêm là $98,832 \mu\text{g/mL}$ (Hình 14b)



Hình 14: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá măng cầu Xiêm.

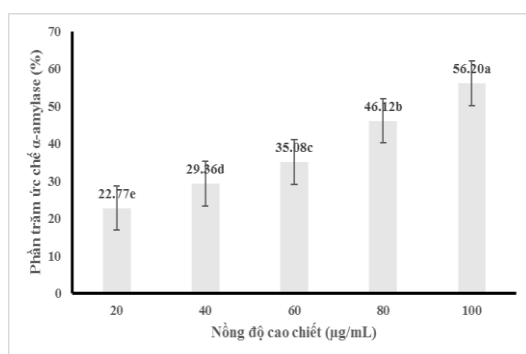
Kết quả phân tích (Bảng 8) cho thấy khi tăng nồng độ cao chiết lá măng cầu ta từ 20-100 ($\mu\text{g/mL}$), phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ cao chiết và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% giữa các nồng độ. Cụ thể, ở nồng độ cao chiết 100 $\mu\text{g/mL}$, khả năng ức chế enzyme α -amylase đạt 78,13% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Khi tăng nồng độ cao chiết lên 20, 40, 60, 80, 100 ($\mu\text{g/mL}$), khả năng ức chế enzyme α -amylase cũng tăng lần lượt là 15,49; 26,77; 51,31; 59,19 và 78,13% (Hình 15a) và vẽ được phương trình $y = 0,7885x - 1,1321$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9778$ với giá trị IC_{50} của cao chiết lá măng cầu ta là 64,85 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 15b)



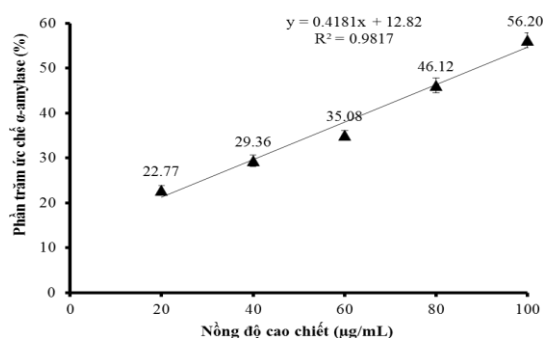
Hình 15: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá măng cầu Ta.

Tương tự, kết quả phân tích (Bảng 8) cho thấy khi tăng nồng độ cao chiết lá bình bát, lá xoài, lá ổi từ 20-100 ($\mu\text{g/mL}$), phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ cao chiết và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

giữa các nồng độ. Cụ thể, ở nồng độ cao chiết 100 $\mu\text{g/mL}$, khả năng ức chế enzyme α -amylase đạt ở lá bình bát, lá xoài và lá ổi lần lượt là 56,20; 67,73 và 87,11% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Khi tăng nồng độ cao chiết lên 20, 40, 60, 80, 100 ($\mu\text{g/mL}$), khả năng ức chế enzyme α -amylase lá bình bát (22,77; 29,36; 35,08; 46,12% (Hình 16a)), lá xoài (30,52; 36,92; 47,19; 53,59; 67,73% (Hình 17a)), lá ổi (34,88; 43,70; 65,41; 78,10; 87,11% (Hình 18a)) và giá trị IC_{50} của cao chiết lá bình bát (88,93 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 16b)), lá xoài 66,17 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 17b), lá ổi 42,94 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 18b).

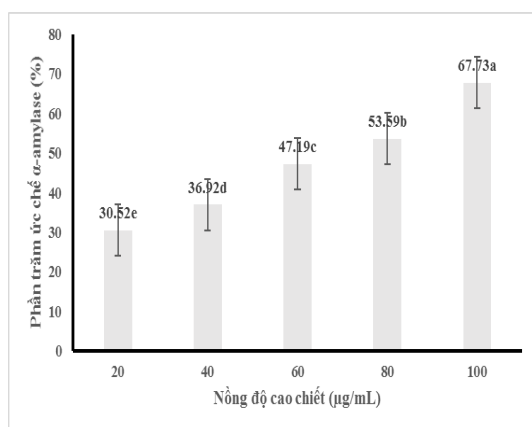


(a)

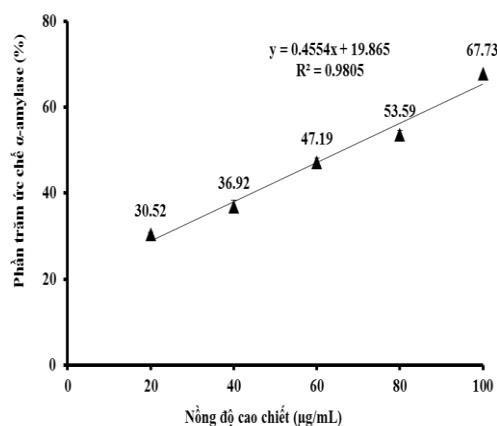


(b)

Hình 16: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.

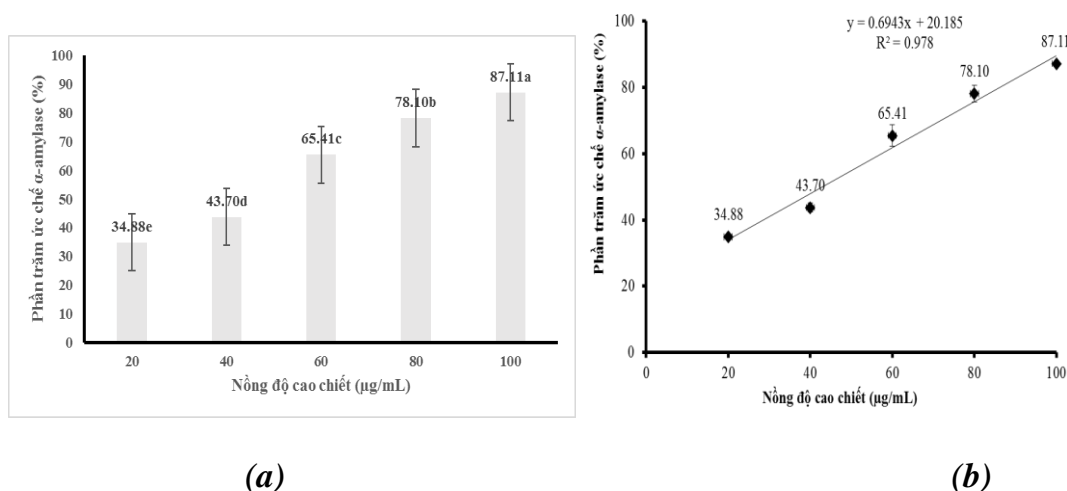


(a)



(b)

Hình 17: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Xoài.



Hình 18: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -amylase của cao chiết ethanol của mẫu lá Ổi.

Kết quả so sánh hiệu quả ức chế enzyme α -amylase của cao chiết lá măng cầu xiêm, lá măng cầu ta, lá bình bát, lá xoài, lá ổi. Tiến hành so sánh giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% enzyme α -amylase) được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9: Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol từ các mẫu lá và Acarbose ức chế enzyme α -amylase.

Mẫu	Giá trị IC_{50} (µg/mL)
Cao chiết lá Măng cầu Xiêm	76,36
Cao chiết lá Măng cầu Ta	64,85
Cao chiết lá Bình bát	88,93
Cao chiết lá Xoài	61,17
Cao chiết lá Ổi	42,94
Acarbose	98,93

Qua kết quả tổng hợp (Bảng 9), cho thấy khả năng ức chế enzyme α -amylase ở acarbose là cao hơn so với các mẫu lá phân tích. Enzyme α -amylase là một enzyme thực hiện bước đầu tiên trong quá trình thủy phân tinh bột, việc làm ức chế enzyme này sẽ dẫn tới một loạt các enzyme biến dưỡng carbohydrate hoạt động sau đó cũng đình trệ. Điều này sẽ hạn chế sự tạo thành glucose sau bữa ăn, giúp người bệnh ĐTD ổn định đường huyết. Chứng tỏ, cao chiết ethanol từ các mẫu lá thí nghiệm có tiềm năng hỗ trợ điều trị bệnh ĐTD thông qua việc ức chế khả năng hoạt động của

enzyme α -amylase. Tuy nhiên, cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa mới khẳng định được công dụng trị bệnh ĐTĐ của các mẫu lá thí nghiệm.

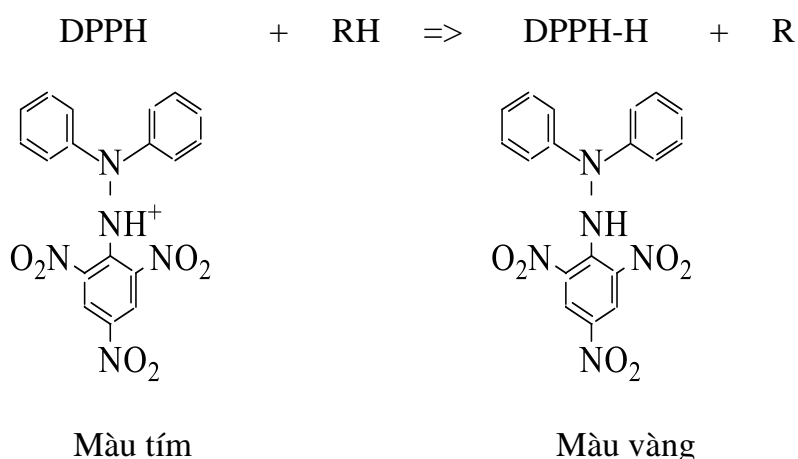
CHƯƠNG III

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT

ETHANOL TỪ CÁC MẪU LÁ

Mục tiêu: xác định khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ các mẫu lá bằng phương pháp DPPH.

Nguyên tắc: DPPH là một gốc tự do bền, dung dịch có màu tím, bước sóng cực đại hấp thu tại 517 nm. Các chất có khả năng kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thu tại bước sóng cực đại, màu của dung dịch phản ứng sẽ nhạt dần, chuyển từ tím sang vàng nhạt (Brown *et al.*, 2003) (Hình 19).



Hình 19: Cơ chế phản ứng trung hòa gốc tự do DPPH.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, gồm 7 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại:

Nghiệm thức 1 (Đối chứng): mẫu không chứa cao chiết.

Nghiệm thức 2: Nồng độ cao chiết là 50 µg/mL.

Nghiệm thức 3: Nồng độ cao chiết là 100 µg/mL.

Nghiệm thức 4: Nồng độ cao chiết là 150 µg/mL.

Nghiệm thức 5: Nồng độ cao chiết là 200 µg/mL.

Nghiệm thức 6: Nồng độ cao chiết là 250 µg/mL.

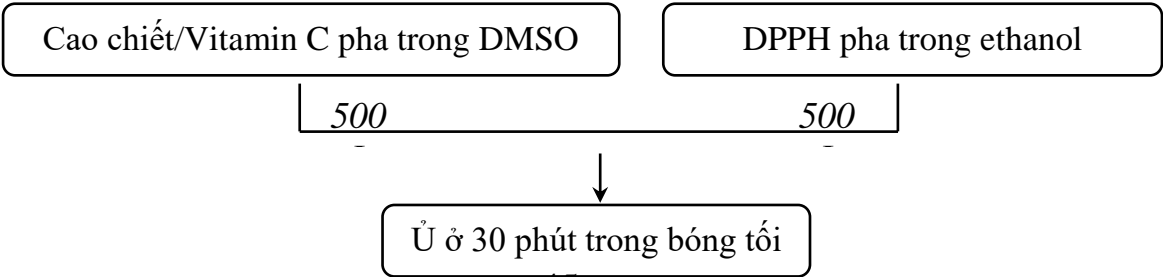
Nghiệm thức 7: Nồng độ cao chiết là 300 µg/mL.

Tiến hành thí nghiệm: Phản ứng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá khoai lang tím bằng phương pháp DPPH được thực hiện theo phương pháp của Shirwaikar et al. (2006) và có điều chỉnh như sau: Cao chiết của các mẫu lá được pha trong DMSO để được dung dịch gốc là 2,5 mg/mL. Vitamin C cũng được pha trong DMSO để được dung dịch đối chứng dương có nồng độ 0,5 mg/mL. DPPH được pha trong ethanol để được dung dịch gốc có nồng độ 0,2 mg/mL và trữ trong tối ở nhiệt độ phòng. 500 µL cao chiết ở các nồng độ khác nhau được cho vào ống nghiệm, sau đó thêm vào mỗi ống nghiệm 500 µL DPPH 0,2 mg/mL và lắc đều. Các ống nghiệm được giữ ổn định trong tối, ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút, sau đó tiến hành đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng $\lambda = 517$ nm. Vitamin C được thực hiện tương tự cao chiết (Bảng 3.4). Đối chứng dương là Vitamin C có 8 mức nồng độ là 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 70 (µg/mL). Sơ đồ bố trí thí nghiệm thử khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10: Bố trí thí nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết ethanol từ các mẫu lá bằng phương pháp DPPH.

Nghiệm thức	Cao chiết (µg/mL)	Vitamin C (µg/mL)	DPPH (mg/mL)
1	0	0	0,2
2	50	10	0,2
3	100	20	0,2
4	150	30	0,2
5	200	40	0,2
6	250	50	0,2
7	300	60	0,2

Quy trình thí nghiệm thử khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH được trình bày trong Hình 20.



↓
Đo quang phổ ($\lambda = 517\text{nm}$)

Hình 20: Quy trình thử hoạt tính kháng oxy hóa bằng DPPH.

Chỉ tiêu đánh giá: Phần trăm khử gốc tự do (%) và giá trị IC_{50} . Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định thông qua phần trăm khử gốc tự do IC (%) được tính theo công thức sau:

$$\text{IC (\%)} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

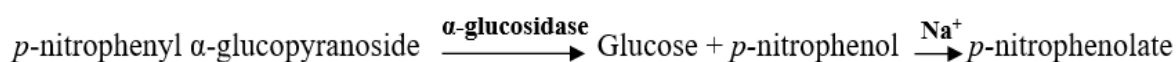
Trong đó: IC: phần trăm ức chế gốc tự do DPPH.

OD_1 : giá trị mật độ quang của mẫu đối chứng.

OD_2 : giá trị mật độ quang của mẫu thật.

Enzyme α -glucosidase của ruột non ở người có vai trò thủy phân các liên kết α -1,4 của oligosaccharide thành glucose và sau đó được hấp thu qua niêm mạc ruột non và thẩm thấu vào máu. Bên cạnh đó, nồng độ glucose trong máu cao là biểu hiện của bệnh ĐTĐ, do đó, ức chế enzyme α -glucosidase sẽ điều khiển được lượng đường huyết trong máu, góp phần điều trị hiệu quả ĐTĐ (Toma *et al.*, 2014).

Trong quá trình thí nghiệm, pNPG được sử dụng như cơ chất của enzyme α -glucosidase. Dưới sự xúc tác của enzyme α -glucosidase, pNPG bị thủy phân thành *p*-nitrophenol. Trong điều kiện có cation Na^+ , *p*-nitrophenol chuyển thành ion *p*-nitrophenolate có màu vàng tươi và được đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 400nm. Phản ứng thủy phân pNPG của enzyme α -glucosidase:



Như vậy, độ hấp thu quang phổ càng cao đồng nghĩa với lượng *p*-nitrophenol tạo ra càng nhiều, hay nói cách khác, độ hấp thu quang phổ tỷ lệ thuận với hoạt tính của enzyme α -glucosidase.

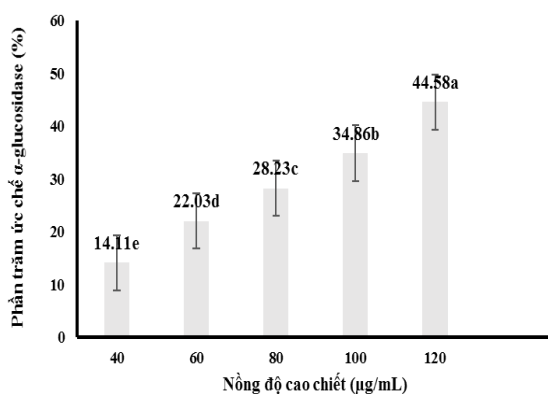
Acarbose được biết đến như một chất ức chế enzyme α -glucosidase và đang được sử dụng phổ biến trong y học hiện đại cho bệnh nhân ĐTD type 2. Acarbose cũng được sử dụng như một đối chứng dương trong các nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của các cao chiết thực vật khác nhau. Thí nghiệm này được thực hiện nhằm xác định khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose trong các điều kiện của thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose được trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose.

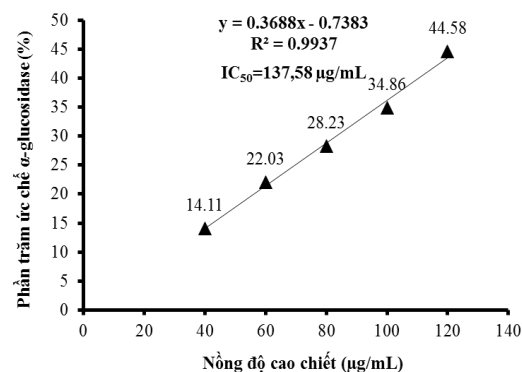
Nồng độ Acarbose ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế α -glucosidase (%)
40	$14,11^e \pm 1,11$
60	$22,03^d \pm 2,83$
80	$28,23^c \pm 1,48$
100	$34,86^b \pm 1,32$
120	$44,58^a \pm 0,97$

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Trong điều kiện thí nghiệm ở nhiệt độ $30-32^\circ\text{C}$, nồng độ enzyme α -glucosidase là 1U/mL và pNPG là 4mM , khả năng ức chế hoạt tính enzyme α -glucosidase tăng dần 14,11; 22,03; 28,23; 34,86; 44,58 và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% giữa các mức nồng độ, tương ứng với sự gia tăng nồng độ Acarbose 40, 60, 80, 100, 120 ($\mu\text{g/mL}$) (Hình 21a). Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose tăng tuyến tính theo sự gia tăng nồng độ. Hoạt tính của enzyme α -glucosidase bị ức chế cao nhất là 44,58%, tiếp theo là 34,86% và ức chế thấp nhất là 14,11%, tương ứng với nồng độ Acarbose là 120, 100 và 40 ($\mu\text{g/mL}$). Dựa vào kết quả phân tích khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của Acarbose, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α -glucosidase của Acarbose giữa các nồng độ khác nhau. Kết quả vẽ được phương trình đường thẳng $y = 0,3688x - 0,7358$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9705$ (Hình 21b). Dựa vào phương trình này, giá trị IC_{50} của Acarbose là $0,14\text{mg/mL}$.



(a)



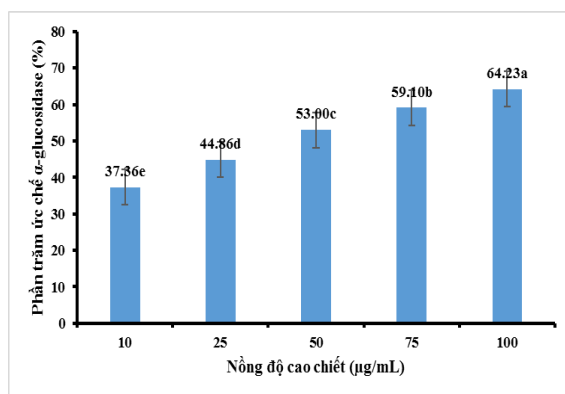
(b)

Hình 21: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α-glucosidase của Acarbose.

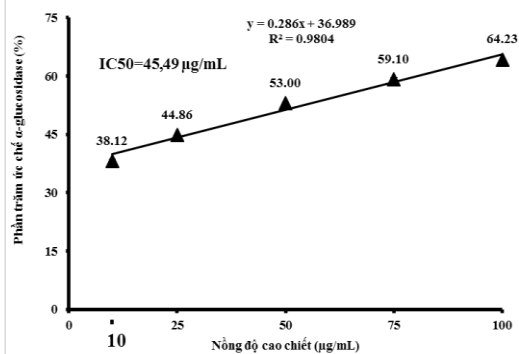
Bảng 12: Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme α-glucosidase của cao chiết ethanol từ các mẫu lá.

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Phần trăm ức chế α-glucosidase (%)				
	Lá măng cầu Xiêm	Lá măng cầu Ta	Lá Bình bát	Lá Xoài	Lá Ổi
10	38,12 ^e ±0,54	23,87 ^e ±1,22	45,71 ^e ±0,53	44,32 ^e ±1,18	9,66 ^e ±1,39
25	44,86 ^d ±0,05	36,82 ^d ±1,21	52,67 ^d ±0,65	47,00 ^d ±0,52	18,00 ^d ±2,38
50	53,00 ^c ±0,46	50,43 ^c ±0,49	62,74 ^c ±0,29	54,07 ^c ±0,15	25,26 ^c ±1,25
75	59,10 ^b ±0,67	58,13 ^b ±0,59	73,55 ^b ±0,49	61,77 ^b ±0,57	38,68 ^b ±0,37
100	64,23 ^a ±1,08	71,41 ^a ±0,25	78,48 ^a ±0,21	70,45 ^a ±0,07	52,72 ^a ±2,66

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

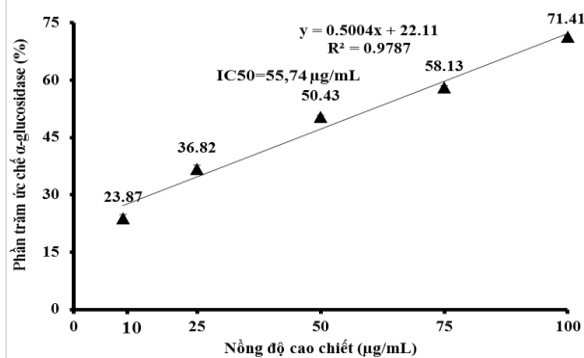
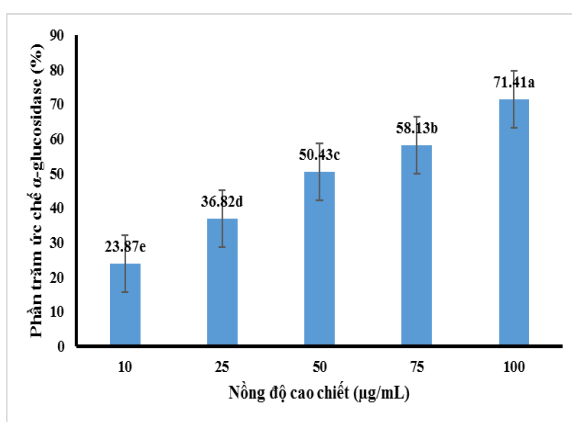


(a)



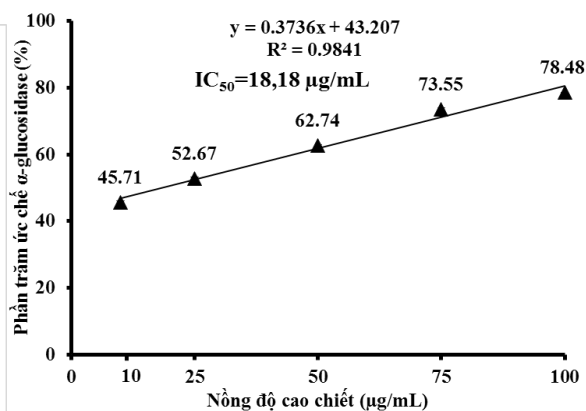
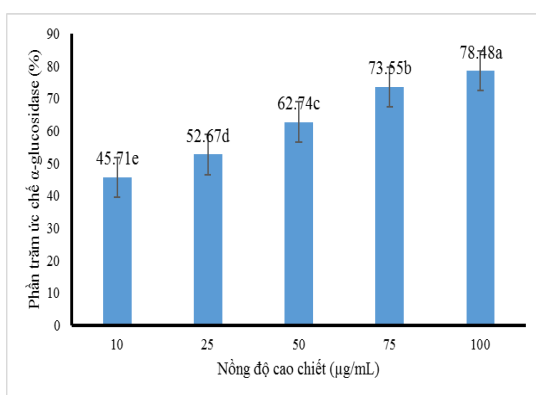
(b)

Hình 22: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá mướp cầu xiêm.



(b)

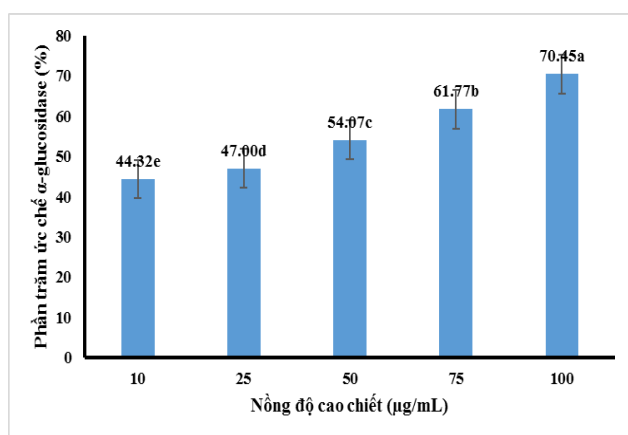
Hình 23: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá mướp cầu ta.



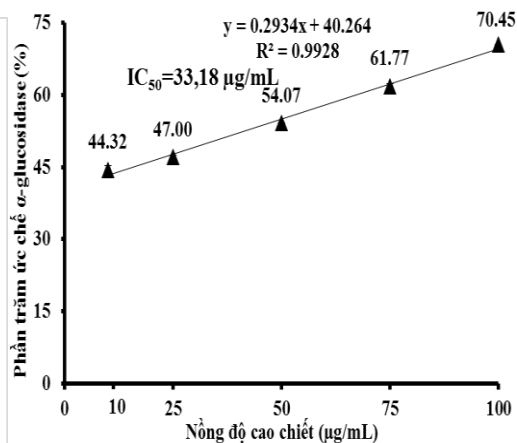
(a)

(b)

Hình 24: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.

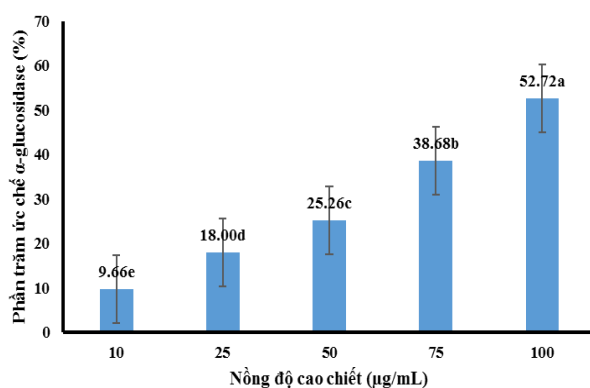


(a)

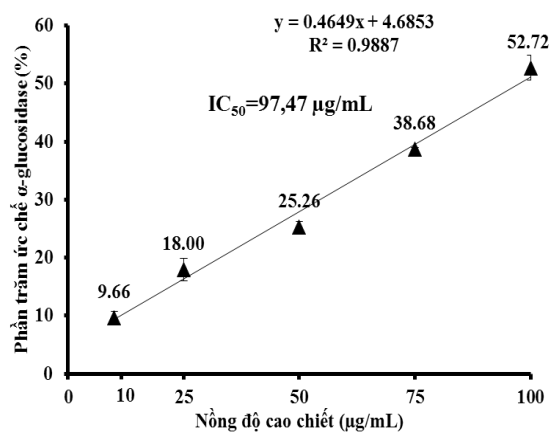


(b)

Hình 25: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Xoài.



(a)



(b)

Hình 26: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết ethanol của mẫu lá Ổi.

Bảng 13: Giá trị IC₅₀ của cao chiết ethanol từ các mẫu lá và Acarbose ức chế enzyme α -glucosidase.

Mẫu	Giá trị IC ₅₀ (μ g/mL)
Cao chiết lá Mãng cầu xiêm	45,49
Cao chiết lá Mãng Ta	55,74
Cao chiết lá Bình bát	18,18
Cao chiết lá Xoài	33,18
Cao chiết lá Ổi	97,47
Acarbose	134,02

CHƯƠNG IV

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÁ MẪU LÁ

Gốc tự do là các nguyên tử (như oxy, nitơ) có ít nhất một electron chưa ghép cặp trong vỏ ngoài cùng và có khả năng tồn tại độc lập. Một gốc tự do có thể dễ dàng được hình thành khi một liên kết hóa trị giữa các thực thể bị hỏng và một electron vẫn còn với mỗi nguyên tử mới được thành lập (Karlsson *et al.*, 1997). Gốc tự do (như gốc hydroxyl, peroxy và superoxide) được sản xuất trong quá trình trao đổi chất bình thường của cơ thể và do stress sinh lý (bao gồm ô nhiễm không khí, khói thuốc lá, tiếp xúc với hóa chất hoặc tia cực tím). Các gốc tự do trong cơ thể là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh như ung thư, bệnh tim mạch, thần kinh, bệnh Alzheimer, suy giảm nhận thức, bệnh Parkinson, bệnh gan do rượu gây ra, viêm loét đại tràng, lão hóa và xơ vữa động mạch (Sas *et al.*, 2007).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của cao ethanol từ các mẫu lá tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Khi tăng nồng độ cao chiết từ 0,05 -0,3 mg/ml, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH càng tăng, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH giữa các nồng độ cao chiết khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (Bảng 13).

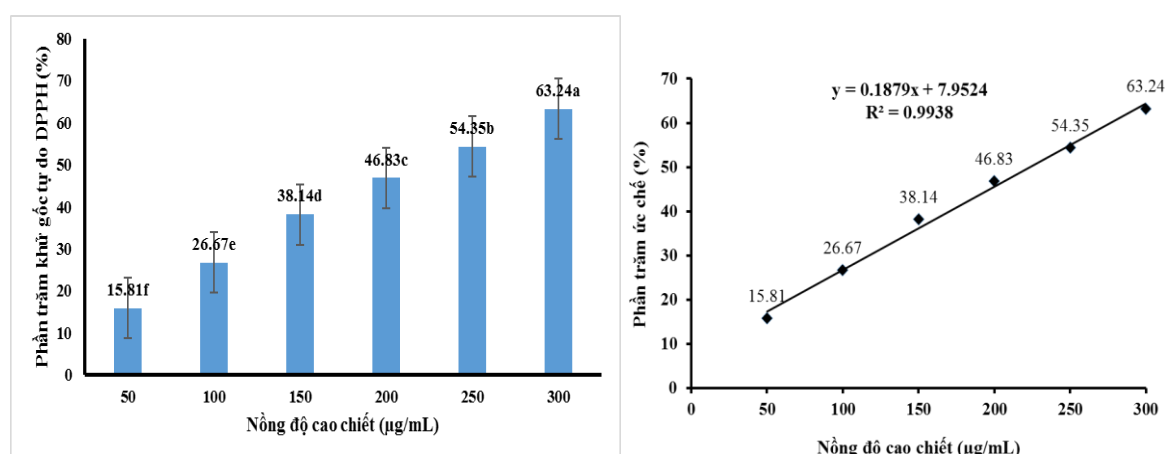
Bảng 13: Khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol từ các mẫu lá.

Nồng độ cao chiết (µg/ml)	Phần trăm ức chế (%)				
	Lá măng cầu xiêm	Lá măng cầu ta	Lá Bình bát	Lá ổi	Lá xoài
50	15,81 ^f ±0,83	13,04 ^f ±1,48	8,89 ^f ±1,50	15,81 ^f ±1,31	11,66 ^f ±0,83
100	26,67 ^e ±1,62	22,53 ^e ±1,47	21,14 ^e ±1,96	25,50 ^e ±1,34	17,58 ^e ±1,58
150	38,14 ^d ±2,38	32,60 ^d ±1,35	25,89 ^d ±0,78	35,18 ^d ±0,68	34,98 ^d ±0,40
200	46,83 ^c ±1,38	40,71 ^c ±1,28	31,02 ^c ±1,62	43,87 ^c ±1,39	44,86 ^c ±0,94
250	54,35 ^b ±0,36	46,44 ^b ±0,61	44,46 ^b ±0,93	51,38 ^b ±0,33	50,59 ^b ±0,00
300	63,24 ^a ±0,40	52,37 ^a ±1,17	54,15 ^a ±0,57	57,70 ^a ±1,54	57,91 ^a ±0,74

Ghi chú: Số có ít nhất một chữ cái (a, b, c, d, e, f) theo sau không giống nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5%.

Cao chiết ethanol lá mãng cầu xiêm ở các nồng độ khác nhau thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau. Cao chiết lá mãng cầu xiêm cho hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH cao nhất là $63,24 \pm 0,40$ ở nồng độ 0,3 mg/ml. Kế đến, ở nồng độ 0,25 mg/ml, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt $62,10 \pm 0,36$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt thấp nhất ở nồng độ 0,05 mg/ml ($15,81^f \pm 0,83$). Điều này cho thấy, cao chiết ethanol lá mãng cầu xiêm có khả năng kháng oxy hóa.

Phương trình đường chuẩn thể hiện khả năng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá mãng cầu xiêm là $y = 0,1879x + 7,9524$. Trong đó, y là phần trăm ức chế (%) và x là nồng độ cao chiết (mg/ml) với $R^2 = 0,9938$ thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ cao chiết (mg/ml) lá mãng cầu xiêm với phần trăm ức chế (%). Với hệ số tương quan $R^2 = 0,9938$ đủ tin cậy để sử dụng đường chuẩn này trong việc xác định giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol 0,9938 là 223,78 μ g/ml (Hình 27b).

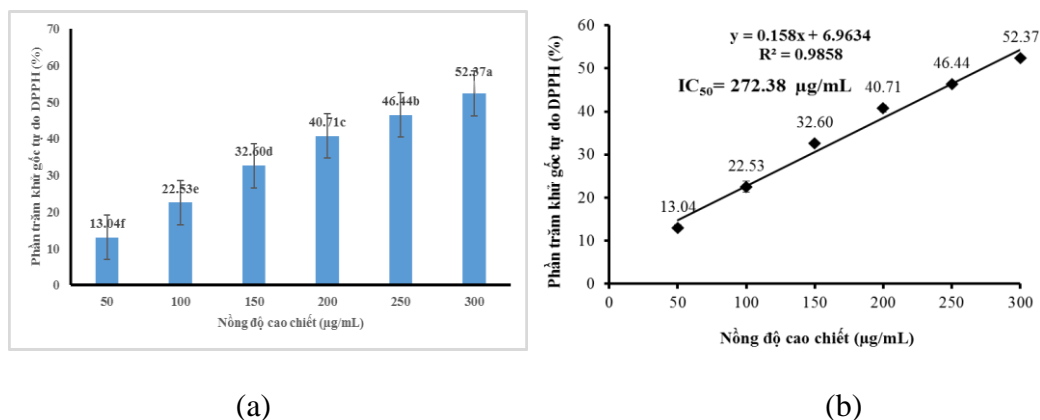


(b)

Hình 27: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Mãng cầu xiêm.

Cao chiết ethanol lá mãng cầu ta ở các nồng độ khác nhau thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau và hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH cao nhất là $52,37 \pm 1,17$ ở nồng độ 0,3 mg/ml. Kế đến, ở nồng độ 0,25 mg/ml, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt $46,44 \pm 0,61$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt thấp nhất ở nồng độ 0,05 mg/ml ($13,04^f \pm 1,48$). Điều này cho thấy, cao chiết ethanol lá mãng cầu ta có khả năng kháng oxy hóa.

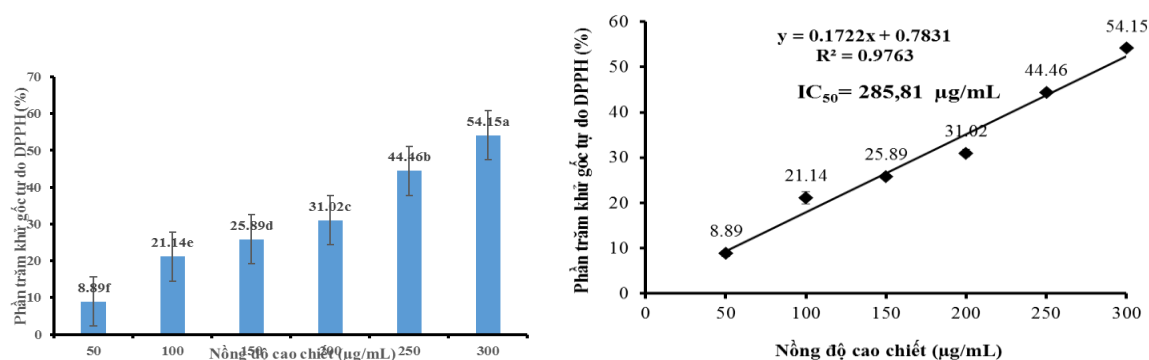
Phương trình đường chuẩn thể hiện khả năng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá măng cầu ta là $y = 0,158x + 6,9634$. Trong đó, y là phần trăm ức chế (%) và x là nồng độ cao chiết (mg/ml) với $R^2=0,9858$ thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ cao chiết (mg/ml) lá măng cầu ta với phần trăm ức chế (%). Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol 0,9858 là 272,38 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 28b).



Hình 28: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Măng cầu ta.

Cao chiết ethanol lá bình bát ở các nồng độ khác nhau thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau và hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH cao nhất là $54,15 \pm 0,57$ ở nồng độ 0,3 mg/ml. Kế đến, ở nồng độ 0,25 mg/ml, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt $44,46 \pm 0,93$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt thấp nhất ở nồng độ 0,05 mg/ml ($8,89 \pm 1,50$). Điều này cho thấy, cao chiết ethanol lá bình bát có khả năng kháng oxy hóa.

Phương trình đường chuẩn thể hiện khả năng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá bình bát là $y = 0,1722x + 0,7831$. Trong đó, y là phần trăm ức chế (%) và x là nồng độ cao chiết (mg/ml) với $R^2=0,9763$ thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ cao chiết (mg/ml) lá bình bát với phần trăm ức chế (%). Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol là 285,81 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 29b).



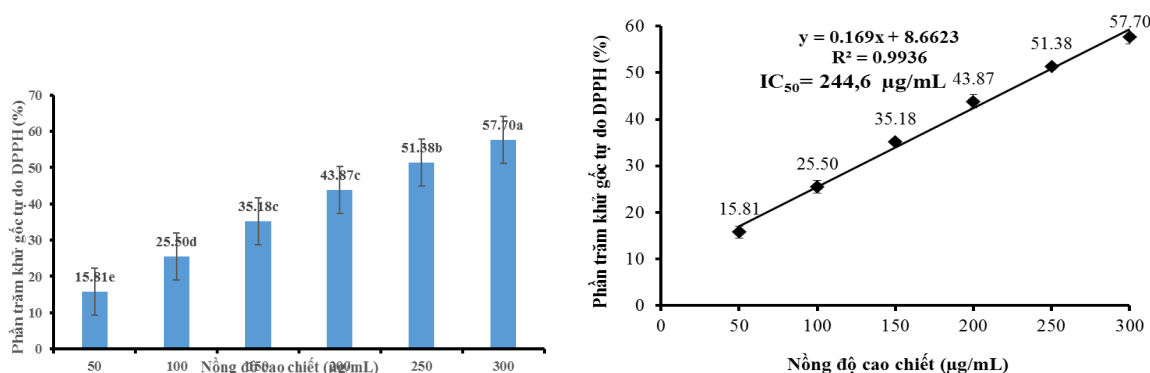
(a)

(b)

Hình 29: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH của cao chiết ethanol của mẫu lá Bình bát.

Cao chiết ethanol lá ổi ở các nồng độ khác nhau thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau và hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH cao nhất là $57,70 \pm 1,54$ ở nồng độ 0,3 mg/ml. Kế đến, ở nồng độ 0,25 mg/ml, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt $51,38 \pm 0,33$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt thấp nhất ở nồng độ 0,05 mg/ml ($15,81^f \pm 1,31$). Điều này cho thấy, cao chiết ethanol lá ổi có khả năng kháng oxy hóa.

Phương trình đường chuẩn thể hiện khả năng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá ổi là $y = 0,169x + 8,6623$. Trong đó, y là phần trăm ức chế (%) và x là nồng độ cao chiết (mg/ml) với $R^2 = 0,9936$ thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ cao chiết (mg/ml) lá ổi với phần trăm ức chế (%). Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol là 244,6 μ g/ml (Hình 30b).

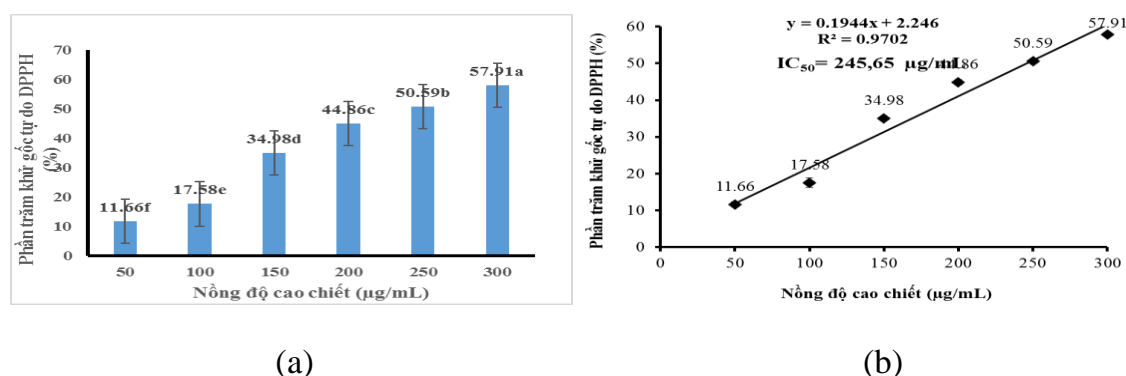


(b)

Hình 30: Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế DPPH cao chiết ethanol mẫu lá ổi

Cao chiết ethanol lá xoài ở các nồng độ khác nhau thì khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH khác nhau và hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH cao nhất là $57,91 \pm 0,74$ ở nồng độ 0,3 mg/ml. Kế đến, ở nồng độ 0,25 mg/ml, hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt $50,59 \pm 0,00$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do DPPH đạt thấp nhất ở nồng độ 0,05 mg/ml ($11,66^f \pm 0,85$). Điều này cho thấy, cao chiết ethanol lá xoài có khả năng kháng oxy hóa. Phương trình đường chuẩn thể hiện khả năng khử gốc tự do của cao chiết ethanol lá xoài là $y = 0,1944x + 2,246$. Trong đó, y là phần trăm ức chế (%) và x là nồng độ cao chiết (mg/ml) với $R^2 = 0,9702$ thể hiện mối tương quan tuyến tính

giữa nồng độ cao chiết (mg/ml) lá ổi với phần trăm ức chế (%). Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol là 245,65 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 31b).



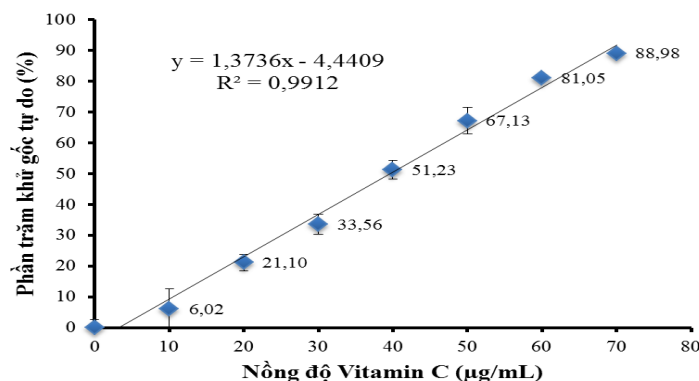
Hình 31: Khả năng ức chế DPPH cao chiết ethanol mẫu lá xoài.

Để có cơ sở đánh giá hoạt tính khử tự do của cao chiết các mẫu lá thí nghiệm, nghiên cứu sử dụng Vitamin C làm chất đối chứng dương. Vì đây là chất có hoạt tính mạnh đối với gốc tự do được sử dụng làm chất chuẩn trong nhiều tài liệu tham khảo. Khả năng khử gốc tự do của Vitamin C được thực hiện với nồng độ tăng dần và kết quả khử gốc tự do của Vitamin C được trình bày trong Bảng 4.9. Từ kết quả khảo sát khả năng khử gốc tự do của Vitamin C bằng phương pháp DPPH, vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm khử gốc tự do vào nồng độ Vitamin C bằng phần mềm Excel, thu được đường thẳng $y = 1,3736x - 4,4409$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9912$ (Hình 32).

Bảng 14. Khả năng khử gốc tự do của Vitamin C bằng phương pháp DPPH.

Mẫu	Nồng độ Vitamin C ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm khử gốc tự do (%)
1	10	$6,02^g \pm 2,49$
2	20	$21,09^f \pm 6,66$
3	30	$33,56^e \pm 2,68$
4	40	$51,23^d \pm 3,18$
5	50	$67,13^c \pm 3,02$
6	60	$81,05^b \pm 4,29$

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.



Hình 32. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm gốc tự do vào nồng độ Vitamin C.

Để đánh giá hiệu quả khử gốc tự do của cao chiết ethanol các mẫu lá, nghiên cứu xác định giá trị IC_{50} . Vì vậy, có thể sử dụng giá trị IC_{50} để so sánh khả năng khử gốc tự do của cao chiết và Vitamin C. Giá trị IC_{50} càng nhỏ, nghĩa là nồng độ có thể loại đi 50% gốc tự do càng nhỏ, thì mẫu được khảo sát có khả năng khử gốc tự do càng mạnh. Từ đồ thị tương quan giữa nồng độ khảo sát và phần trăm khử gốc tự do, tiến hành xác định giá trị IC_{50} (kết quả được trình bày trong Bảng 15).

Bảng 15. Giá trị IC₅₀ của cao chiết ethanol lá khoai lang tím và Vitamin C

Mẫu khảo sát	Giá trị IC ₅₀
Cao chiết ethanol lá măng cầu xiêm	223,12µg/mL
Cao chiết ethanol lá măng cầu ta	272,38 µg/mL
Cao chiết ethanol lá bình bát	285,81 µg/mL
Cao chiết ethanol lá ổi	244,6 µg/mL
Cao chiết ethanol lá xoài	245,65 µg/mL
Vitamin C	39,63µg/mL

Kết quả phân tích cho thấy, với giá trị IC₅₀ của Vitamin C là 39,63µg/mL, của cao chiết lá măng cầu xiêm cao hơn so với nghiên cứu năm 2016 của Thomas (209,4 µg/mL) và lá măng cầu ta, bình bát, ổi lần lượt là 272,38 µg/mL; 285,81 µg/mL; 244,6 µg/mL; 245,65 µg/mL có khả năng khử gốc tự do thấp hơn Vitamin C lần lượt là 7,2; 6,2; 6,2. Kết quả cho thấy, cao chiết ethanol các mẫu lá thí nghiệm có hoạt tính chống oxy hóa nhưng hiệu quả thấp hơn Vitamin C.

PHẦN KẾT LUẬN

1. Kết luận

Các mẫu lá măng cầu xiêm, măng cầu ta, bình bát, ổi, xoài có khả năng ức chế enzyme α -amylase, α -glucosidase và chống oxy hóa.

Độ ẩm và hiệu suất các mẫu lá măng cầu xiêm, măng cầu ta, bình bát, ổi, xoài lần lượt là có độ ẩm 30,00; 55,26; 56,67; 66,33; 30,91 và hiệu suất chiết 8,8; 5,4; 4,8; 3,6; 8,3

Hiệu quả ức chế enzyme α -amylase các mẫu lá măng cầu xiêm, măng cầu ta, bình bát, ổi, xoài lần lượt là 76,36; 64,85; 88,93; 42,94; 61,17 $\mu\text{g/mL}$

Hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase các mẫu lá măng cầu xiêm, măng cầu ta, bình bát, ổi, xoài lần lượt là 45,49; 55,74; 18,18; 33,18; 97,47 $\mu\text{g/mL}$.

Cao chiết ethanol của lá măng cầu xiêm, măng cầu ta, bình bát, ổi, xoài có khả năng khử gốc tự do với giá trị IC_{50} lần lượt là 223,12; 272,38; 285,81; 244,6; 245,65 $\mu\text{g/mL}$.

2. Kiến nghị

Nghiên cứu thử nghiệm độc tính và khả năng làm giảm nồng độ glucose của các mẫu lá trên chuột bị gây đái tháo đường; từ đó, làm tiền đề cho quá trình nghiên cứu và sản xuất dược phẩm có khả năng điều trị bệnh đái tháo đường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Saikhhan, M.S., L.R. Howard and J.C. Miller. 1995. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of food science*, 60(2): 341-343.
- Akkarachiyasit S, Charoenlertkul P, Yibchok-anun S and Adisakwattana S. 2010. Inhibitory activities of Cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Int. J. Mol. Sci*, 11: 3387-3396.
- Aree, T., N. Supkamonseni and R. Srisawat, 2014. Inhibitory potential of the Rambutan rind extract and tannin against alpha-amylase and alpha-glucosidase activities *in vitro*. *International Conference on Food, Biological and Medical Sciences*, 28-29.
- Abdul M., Katrin, Azizahwatiu, A. Andriani, K.F. Mahmudah and M. Mashita, 2013. Screening of α -glucosidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants. *Int. J. Med. Arom. Plants* 3 (2): 144-150.
- Bộ Y tế, 2007. Hóa sinh học, NXB. Y học, Hà Nội.
- Burke, M., R. Edge, E.J. Land and T.G. Truscott. 2001. Characterization of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 60: 1-6.
- Brown C.R., D. Culley, C.P. Yang. and D.A. Navarre, 2003. Breeding Potato with High Carotenoid Content. Proceedings Washington State Potato Conference, Moses Lake, Wa. 23-26.
- Bello, A.A. Aliero, Y. Saidu và S. Muhammad, 2011. Phytochemical screening, polyphenolic content and alpha-glucosidase inhibitory potential of *Leptadenia hastata* (pers.) decne. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 19 (2): 181-186.
- Brown C.R., D. Culley, C.P. Yang. and D.A. Navarre, 2003. Breeding Potato with High Carotenoid Content. Proceedings Washington State Potato Conference, Moses Lake, Wa. 23-26.
- Chirinos, R., D. Campos, C. Arbizu, H. Rogez, J.F. Rees, Y. Larondelle, G. Noratto and L. Cisneros-Zevallos. 2007. Effect of genotype, maturity stage and

- postharvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity of Andean mashua tubers. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 87: 437-446.
- Colak, E., N. Majkic-Singh, S. Stankovic, V. Sreckovic-Dimitrijevic, P.B. Djordjevic, K. Lalic and N. Lalic. 2005. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med*, 37(8): 613-620.
- Caro J.J., A.J. Ward and J.A. O'Brien, 2002. Lifetime costs of complications resulting from type 2 diabetes in the U.S", *Diabetes Care*, 25, pp.476– 481.
- Cockram, C.S., 2000. The epidemiology of diabetes mellitus in the Asia-Pacific region", *Hong Kong Med J*, 6(1), pp.43-52.
- Đỗ Quý Hai, 2006. Giáo trình công nghệ sinh học enzyme, Đại học khoa học- Đại học Huế.
- Đái Thị Xuân Trang, Phạm Thị Lan Anh, Trần Thanh Mến và Bùi Tấn Anh. 2012. Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá ổi (*Psidium guajava* L.). *Tạp chí khoa học*, 2012: 22b 163-171.
- Deguchi Y, Osada K, Uchida K, Kimura H, Yoshikawa M, Kudo T, et al. (1998), "Effects of extract of guava leaves on the development of diabetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects", *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 72, pp.923-932
- Dutta, Srijita. 2015. Sweet potatoes for diabetes mellitus: a systematic review. *Pharmacophore*, 6(1): 60-72.
- Duman, B.S., M. Ozturk, S. Yilmazeri and H. Hatemi. 2003. Thiols, malonaldehyde and total antioxidant status in the Turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med*, 201(3): 147-155.
- Elsnoussi A.H.M., M.J.A. Siddiqui, L.F. Ang, A. Sadikun, S.H. Chan, S.C.Tan, M.Z. Asmawi và M.F. Yam, 2012. Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *Mohamed et al. BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:176.

- Gopa G., and S. Lan, 2004. Chronic complications of diabetes mellitus, Department of Medicine Washington University, pp. 282-485.
- Hippisley, C.J., 2009. *Predicting risk of type diabetes in England and Wales: Prospective derivation and validation of QDScore*. BMJ.
- Hoàng Trung Vinh. 2006. Kháng insulin và chức năng tiết của tế bào beta ở bệnh nhân đái tháo đường type 2 tuổi trên 60. *Tạp chí y học thực hành*, trang 252.
- Hoàng Trung Vinh, 2006. Kháng insulin và chức năng tiết của tế bào beta ở bệnh nhân đái tháo đường type 2 tuổi trên 60. *Tạp chí y học thực hành*, trang 252.
- Hsieh, P., H.Y. Ling, G. Jhong, M. Hsing, S. Shyun, H.W. Chi and C.Y. Shiun, 2011. Hepatoprotective effect of theaqueous extract of *Flemingia macrophylla* on carbontetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats throughanti-oxidative activities. *Am. J. Chin. Med.* 39, 349-365
- Hogan, Shelly Patricia. 2009. Grape extracts for type 2 diabetes treatment through specific inhibition of α -glucosidase and antioxidant protection. *Food Science and Technology*.
- Hồ Ngọc, Nguyễn Thị Phương Thuý. 2012. "Tính an toàn và khả năng kiểm soát đường huyết của hỗn hợp chiết tách từ lá vối, lá ổi, lá sen trên chuột đái tháo đường", *Tạp chí Y học Dự phòng*, 22(3), tr.59-66.
- Hogan S, L. Zhang, J. Li, S. Sun, C. Canning and K. Zhou, 2010. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & Metabolism*, 7 :71-79.
- Hà Bích Ngọc, 2012. *Điều tra, nghiên cứu một số thực vật Việt Nam có tác dụng hỗ trợ điều hòa lượng đường trong máu để ứng dụng cho bệnh nhân đái tháo đường type 2*. Luận án tiến sĩ Hóa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.
- Jeanette, S.J., K. H. Alex, J.R. David and E. Advie. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *BioMed Central*, 4(5).
- Jovanovic, S.V. and M.G. Simic. 2000. Antioxidants in nutrition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 326-334.

- Jayendra, Y. Kumar và S. Sadish Kumar. 2013. Two new tetrahydroisoquinoline analogs from Indian medicinal plant *Annona squamosa*. *Journal of pharmacy research* 7
- Karlsson, J. 1997. Introduction to neuterology and radical formation. *Human Kinetics Press*, 1-143.
- Khan, A., N.A. Bryden and M.M. Polansky, 1990. Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices", *Biol Trace Elem Res*, 24(3), pp.183-188.
- Kraft, S., 2011. Mystery Diabetes Type 3 Hybrid; Alzheimer's Drug May Help. *Medical New Today*.
- Kumar S., S. Narwal, V. Kumar and O. Prakash, 2011. Alpha-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev*, 5 (9): 19-29.
- Kumar A.S., V. Venkatarathanamma, K. Suneeta and B.S. Kumari, 2011. Comparative In vitro screening of a-Amylase and a-Glucosidase enzyme Inhibitory studies in leaves of *Annona species*. *Journal of Pharmacy Research* 4 (12), 4431-4434.
- Lachman, J., K. Hamouz, M. Orsak and V. Pivec. 2000. Potato tuber as a significant source of antioxidants in human nutrition. *Rostlinna vyroba*, 46: 231-236.
- Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu. 2009. Stress oxy hóa và các chất chống oxy hóa tự nhiên. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7(5): 667-677.
- Lê Thị Thu. 2008. Nghiên cứu một số chỉ số đánh giá tình trạng stress oxy hóa và tác dụng chống oxy hóa Belaf ở bệnh nhân ĐTĐ type 2. *Học viện Quân Y Hà Nội*.
- Leung, G.M., and K.S.L. Lam, 2000. Diabetic complication and their implications on health care in Asia", *Hong Kong Med J*, 6(1), pp.61-68.
- Manikandan R., A.V. An và G. Durai Muthumani, 2013. Phytochemical and in vitro anti-diabetic activity of methanolic extract of *Psidium guajava* leaves. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2 (2): 15-19.
- Mutiu I.K., S.M. Ogungbe, G.M.Saibu và O.M. Aboyade, 2014. In vitro study on the hypoglycemic potential of *Nicotiana tabacum* leaf extracts. *Bangladesh J Pharmacol* 9: 140-145.

- Mutiu IK., J.V Ogunbiyi và A.O. Ashafa, 2013. In vitro studies on the inhibition of α -amylase and α -glucosidase by leaf extracts of *Picralima nitida* (stapf). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* October 12 (5): 719-725.
- Miura T., S. Takagi and T. Ishida, 2012. Management of diabetes and its complications with Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, Article ID 871495, 8 pages.
- Mutiu, I.K., S.M. Ogungbe, G.M. Saibu and O.M. Aboyade, 2014. In vitro study on the hypoglycemic potential of *Nicotiana tabacum* leaf extracts. *Bangladesh J Pharmacol*, 9: 140-145.
- Nguyễn Hải Thủy. 2006. Đặc điểm kháng insulin trong bệnh nhân đái tháo đường. *Tạp chí Y học thực hành*, 548: 17-18.
- Nicole, C. 2001. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6): 569-590.
- Niki, E., N. Noguchi, H. Tsuchihashi and N. Gotoh. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *American Journal of Nutrition*, 62: 1322-1326.
- Nguyen H.T., and S.M. Kim, 2009. Three compounds with potent α -glucosidase inhibitory activity purified from sea cucumber *Stichopus japonicus*", Summer program In Sensory Evaluation, 112-122.
- Nguyễn Thị Nguyên Sinh, Nguyễn Phương Dung. 2010. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và độc tính của cao chiết khổ qua-đậu bắp trên chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y học TP.Hồ Chí Minh* 14 (2).
- Nguyễn Trần Châu Đỗ Mai Anh, Đỗ Mộng Quỳnh. 2012. Khảo sát tác động hạ đường huyết của vỏ thân vùng quả xoan (*Careya arboreae* roxb. lecythidaceae). *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh* 16 (1).
- Nguyễn Văn Ba và Phạm Xuân Phong, 2014. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và độc tính của cao lá dâu trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí y – dược học quân sự số 4-2014*.
- Natasha J., S.P Srivastava, V. Bhatia, A.Mishra, A.K Sonkar, T.Narender, A.K Srivastava và A.K Tamrakar, 2012. Inhibition of alpha-glucosidase by *Acacia*

- niloticaprevents* hyperglycemia along with improvement of diabetic complications via aldose reductase inhibition. *J Diabetes Metab* 2012, S:6.
- Nathan D.M., J.B. Buse and M.B. Davidson, 2006. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 29: 1963-1972
- Ozdemir, H., M. Karacorlu and S. Karacorlu. 2005. Serous macular detachment in diabetics cystoid macular oedema. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 83(1): 63-66.
- Ooi CP, Yassin Z, Hamid TA (2010), "Momordica charantia for type 2 diabetes mellitus", *Cochrane Database Syst Rev*, 2, CD007845
- Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2009. Enzyme và ứng dụng, NXB. Giáo dục, tr. 56-80.
- Polyzos, S.A., J. Kountouras, C. Zavos and G. Deretzi. 2011. The Potential Adverse Role of Leptin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Hypothesis Based on Critical Review of the Literature. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(1): 50.
- Powers, A.C., 2008. Diabetes Mellitus. *The Principles of Harrison's Internal Medicine*, 2280-2282.
- Proctor, P.H. 1989. Free radicals and human disease. *CRC handbook of free radicals and antioxidants*, 1: 209-221.
- Phùng Thanh Hương. 2010. *Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lãg nước ở Việt Nam*, Luận án tiến sỹ dược học, Trường đại học Dược Hà Nội
- Raman A, Lau C (1996), "Anti-diabetic properties and phytochemistry of Momordica charantia L. (Cucurbitaceae)", *Phytomed*, 2, pp.349-362
- Singh, N. and P.S. Rajini. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food chemistry*, 85: 611-616.

- Sales P. M., P.M. Souza and D. Silveira, 2012. Alpha-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci*, 15 (1):
- Schomburg, D. and M. Salzmann. 1991. Enzyme handbook 4. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*, pp. 115-123.
- Shirwaikar, A., K. Rajendran and I.S. Punithaa, 2006. In vivo antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol Pharm Bull*, 29: 1906-1910.
- Trần Hùng. 2012. Phương pháp nghiên cứu dược liệu. Trường Đại học Y dược, Thành Phố Hồ Chí Minh, 105-127.
- Trần Thị Thu Hằng. 2007. *Dược lực học*. Nxb Phương Đông.
- Tripathi, U.N. and D. Chandra. 2009. The plant extracts of *Momordica charantia* and *Trigonella foenum graecum* have antioxidant and anti-hyperglycemic properties for cardiac tissue during diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (5): 290-296.
- Thái Hồng Quang. 2008. Dự phòng hoặc làm chậm xuất hiện bệnh đái tháo đường type 2. *Tạp chí Y học thực hành (616 – 617)*, trang 69.
- Tạ Văn Bình . 2007. *Những nguyên lý nền tảng bệnh đái tháo đường tăng glucose máu*. NXB Y học, Hà Nội.
- Tạ Văn Bình , 2003. Dịch tễ học bệnh đái tháo đường - Các yếu tố nguy cơ và các vấn đề liên quan đến quản lý bệnh đái tháo đường tại khu vực nội thành 4 thành phố lớn, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Tạ Văn Bình , 2006. Dịch tễ học bệnh ĐTĐ ở Việt nam các phương pháp điều trị và biện pháp dự phòng, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Tạ Văn Bình , 2008. Điều tra đái tháo đường toàn quốc năm 2008, Viện nội tiết Trung ương Hội nghị khoa học hội dinh dưỡng Việt nam lần thứ 4.
- Tạ Văn Bình , 2008. Bệnh đái tháo đường - Tăng glucose máu nguyên lý và nền tảng, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Trần Thị Minh Diễm, Đào Thị Dừa. 2010. *Bệnh đái tháo đường type 1 và Hội chứng đa nội tiết tự miễn*. NXB Đại học Huế, trang 150.
- Trần Hữu Dàng. 2008. Giáo trình sau Đại học chuyên ngành Nội tiết – Chuyển hóa. NXB Đại học Huế, trang 221 – 246.

- Uzma, S. and I.S. Mohammad, 2008. Probing ligand binding interactions of human alpha glucosidase by homology modeling and molecular docking. *International journal of integrative biology*, 2(2): 116-121.
- Vansant, G., J. Pincemail, J.O. Defraigne, C.J. Van, P. Goyens and S. Hercberg. 2004. Antioxidants et alimentation. *Institut Danone*, pp. 67.
- Weibing, W.MD , P. W. McGreevey and M.D.C. Fu, 2009. Type 2 Diabetes Mellitus in China: A Preventable Economic Burden", *The American J of manages care*, 15(9), pp.593-601.
- Yip, V.L. and S.G. Withers, 2004. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharide. *Org Biomol Chem*, 2(19): 2707-2713.