

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE TỪ CAO CHIẾT LÁ SẦU ĐẬU (*Azadirachta indica* A. JUSS) TỈNH AN GIANG

Lâm Bảo Như Phương¹, Dương Xuân Chữ², Nguyễn Thị Ngọc Vân²,
Nguyễn Phạm Tuấn¹ và Nguyễn Phạm Tú¹

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang

² Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

TÓM TẮT

Đái tháo đường type 2 là tình trạng rối loạn chuyển hóa đa nguyên nhân, không kiểm soát được, gây ra những biến chứng nguy hiểm. Kiểm soát bệnh đái tháo đường type 2 bằng việc ức chế enzyme α -glucosidase là một trong những liệu pháp đang được sử dụng góp phần ổn định đường huyết sau bữa ăn. Với mục tiêu tìm ra nguồn dược liệu có chứa nhiều hợp chất tiềm năng có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trong điều trị bệnh đái tháo đường. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích định danh chính xác tên loài, đánh giá khả năng ức chế α -glucosidase từ cao chiết lá Sầu Đậu ở mức độ *in vitro*. Kết quả của đề tài đã thu thập, phân tích, bước đầu xác định được đúng tên khoa học của cây Sầu Đậu tại xã Lê Trì, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang là *Azadirachta indica* A.Juss, họ Meliaceae thông qua trình tự *rbcL* với độ tương đồng 99%. Cả 7 loại cao chiết lá Sầu Đậu đều có hoạt tính ức chế α -glucosidase, đạt hiệu quả cao nhất ở cao chiết chloroform với IC₅₀ đạt 142,0 μ g/mL, tiếp đến là cao ethanol 70, cao ethanol 96, cao methanol, cao nước, cao ethyl acetate và kém nhất là cao petroleum ether với IC₅₀ lần lượt là 160,1 μ g/mL; 174,4 μ g/mL; 197,2 μ g/mL; 228,4 μ g/mL; 237,2 μ g/mL và 235,8 μ g/mL.

Từ khóa: α -glucosidase, đái tháo đường type 2, lá Sầu Đậu, Lineweaver-Burk.

MỞ ĐẦU

Đái tháo đường là bệnh rối loạn chuyển hóa, trong đó hoạt động của insulin bị suy giảm hoặc sự thiếu hụt insulin tuyệt đối dẫn đến sự mất cân bằng chuyển hóa glucose và dẫn đến hội chứng đặc trưng bởi tăng đường huyết (Klein *et al.*, 2007). Sự phát triển của bệnh đái tháo đường 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 đái tháo đường. Đái tháo đường có thể trực tiếp hay gián tiếp gây nên các rối loạn như tăng đường huyết, bệnh võng mạc, suy thận, bệnh thiếu máu tim, bệnh thần kinh, xơ vữa động mạch,... (Dutta and Srijita, 2015). Do vậy, đái tháo đường được xem là bệnh khó kiểm soát, ảnh hưởng lớn đến toàn cầu và đến nay vẫn chưa có thuốc trị khỏi hoàn toàn (Mishra *et al.*, 2009). Hiện nay, các loại thuốc tổng hợp như: acarbose, miglitol, voglibose,... có khả năng ức chế enzyme thủy phân carbohydrate như α -amylase và α -glucosidase. Tuy nhiên, chúng có giá thành cao và gây ra nhiều tác dụng phụ và không làm giảm các biến chứng đái tháo đường (Cheng and Fantus, 2005). Do đó, việc tìm ra các thuốc mới có hiệu quả cao, ít tác dụng phụ và giá thành hợp lý đang là vấn đề cấp thiết, thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học. Trong những năm gần đây, các hợp chất có nguồn gốc từ các cây dược liệu có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase đang được quan tâm nghiên cứu và cho thấy kết quả khả quan như: lá Dâu tằm (Habeeb *et al.*, 2012), lá Ôi (Đái Thị Xuân Trang *et al.*, 2012), Khổ qua (NamDeo *et al.*, 2013), vỏ Chôm chôm (Aree *et al.*, 2014), Rong nâu (Muhamad, Prihanto, 2014) và vỏ Măng cụt (Taher *et al.*, 2016). Sầu Đậu được biết đến như là một trong những cây dược liệu đa năng nhất có nhiều dược tính sinh học, rất hữu ích trong việc điều trị nhiều bệnh như sốt rét, đau thần kinh cơ, nhiễm trùng da, tiểu đường, ung thư và bệnh tim. Khả năng chống đái tháo đường đã được chứng minh khoa học ở những con chuột bị bệnh tiểu đường sau khi dùng trong hai tuần (Sudha *et al.*, 2011). Trên cơ sở đó, đề tài: "Khảo sát khả năng ức chế enzyme α -glucosidase từ cao chiết lá Sầu Đậu (*Azadirachta* sp.)" được thực hiện làm cơ sở cho quá trình nghiên cứu và sản xuất dược phẩm có khả năng điều trị bệnh đái tháo đường trong tương lai.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Lá cây Sầu Đậu thu tại xã Lê Trì, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ, máy cô quay chân không, α -glucosidase, Para-Nitrophenyl α -D-glucopyranosid (Sigma-Aldrich),... hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phân tích trình tự vùng gen *rbcl*

Mẫu lá non của Sầu Đầu được ly trích và tinh sạch DNA theo phương pháp CTAB rút gọn (Doyle *et al.*, 1990). Trình tự cặp mồi RbCL sử dụng trong phản ứng PCR (Kress and Erickson, 2007). *rbcl* – AF: 5' – ATGTCACCACAAACA GAGACTAAAGC – 3'; *rbcl* – AR: 5' – CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC – 3'.

Phương pháp chiết cao lá Sầu Đầu

Lá cây Sầu Đầu sau khi thu hái được đem về phòng thí nghiệm, loại bỏ những phần bị sâu bệnh. Sau đó rửa sạch, để khô, tiến hành cắt nhỏ và sấy ở nhiệt độ 60°C từ 48 - 72 giờ. Tiến hành ngâm dầm phần lá cây Sầu Đầu với dung môi là ethanol 70% theo tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (1:10 w/v) trong bình kín để trong tối, ở nhiệt độ phòng. Sau 72 giờ, phần dịch trích của lá được lọc qua giấy lọc, thu lấy dịch lọc và bỏ phần bã. Dịch lọc được loại bỏ dung môi bằng máy cô quay chân không, thu được cao chiết lá với hệ dung môi ethanol 70%. Làm tương tự như trên, ta thu được lần lượt các cao chiết petroleum ether, cao chloroform, cao ethyl acetat, cao ethanol 96% và cao methanol. Với cao chiết nước, tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1/10 (w/v) ở 90°C trong 2 giờ, tiến hành lọc dịch ngâm qua giấy lọc, lấy phần dịch lọc và bỏ phần bã. Phần dịch lọc thu được tiến hành loại bỏ dung môi bằng máy cô quay và thu được cao chiết nước... Các cao chiết từ lá Sầu Đầu được trữ ở nhiệt độ -20°C và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Định tính một số hợp chất thiên nhiên có trong cao chiết lá Sầu Đầu

Tiến hành xác định một số hợp chất trong cao chiết lá Sầu Đầu theo Yadav *et al.* (2014).

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cao chiết lá Sầu Đầu đến khả năng ức chế enzyme α -glucosidase

Acarbose được sử dụng làm chất chuẩn với các nồng độ lần lượt là 25-500 (μ g/ml). Phản ứng giữa enzyme α -glucosidase và cơ chất pNPG được thực hiện theo Qaisar *et al.*, (2014): Các loại cao chiết lá Sầu Đầu được pha loãng trong DMSO, ly tâm 10 phút, thu phần dịch và pha loãng thành các nồng độ (μ g/ml). Đồng thời, enzyme α -glucosidase được pha trong đệm phosphate pH = 7 ở nồng độ 0,2 U/ml. Thí nghiệm được bắt đầu bằng cách ủ 100 μ l dung dịch enzyme α -glucosidase nồng độ 0,2 U/ml với 50 μ l dung dịch cao chiết ở các mức nồng độ khác nhau ở 37°C trong 10 phút. Kế đó, thêm 50 μ l pNPG 4mM như cơ chất cho phản ứng vào hỗn hợp rồi ủ ở 37°C trong 20 phút. Cuối cùng, phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 1.000 μ l Na₂CO₃ 0,2M. Sản phẩm *p*-nitrophenol được tạo thành từ pNPG được xác định bằng cách đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 405 nm. Dựa vào lượng para-nitrophenol tạo thành từ pNPG trong phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thu quang phổ. Phần trăm enzyme α -glucosidase bị ức chế (%) = (B-A)/B x 100.

Trong đó: A: Giá trị quang của mẫu thí nghiệm; B: Giá trị quang của mẫu đối chứng.

Phương pháp thống kê

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và các giá trị trung bình được trình bày dưới dạng sai số chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích trình tự vùng gen *rbcl*

Kết quả giải trình tự gene mẫu lá sầu đầu thu thập và so sánh với cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng gen NCBI để tìm loài có độ tương đồng cao, qua đó có cơ sở để định danh Sầu Đầu đã thu thập được. Kết quả giải trình tự gen của mẫu Sầu Đầu ghi nhận ở Hình 1, dài 1.477 bps có tỷ lệ đồng hình 99%, độ phủ 100% với trình tự *rbcl* của *Azadirachta indica* (Accession: MH360740.1) và chỉ số E-Value ở mức 0 là hoàn toàn tin cậy được, có thể kết luận rằng mẫu Sầu Đầu có tên khoa học là *Azadirachta indica*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Azadirachta indica ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	MH360740.1
Azadirachta indica ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	M9946850.1
Azadirachta indica ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	M9946823.1
Azadirachta indica isolate AD7LJ02 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	MF349454.1
Azadirachta indica voucher PFC160529-0001 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	KV985301.1
Azadirachta indica isolate UH5 R20 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	K0015721.1
Azadirachta indica isolate PDBKT0009-0014 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	K9675896.1
Azadirachta indica isolate DNAG-5F-59757 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, partial cds, chloroplast	918	918	100%	0.0	99%	KJ735965.1
Azadirachta indica chloroplast, complete genome	918	918	100%	0.0	99%	KF986330.1

Hình 1. Kết quả so sánh trình tự gene của lá Sầu đầu trên ngân hàng gene NCBI

Kết quả trích cao từ lá Sầu Đầu

Độ ẩm trung bình của bột lá Sầu Đầu là 7,92%. Độ ẩm là hàm lượng nước tự do có trong mẫu, độ ẩm mẫu càng cao thì lượng nước trong mẫu càng nhiều. Theo Dương Thị Phượng 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. Việc xác định hàm lượng nước có trong mẫu trước khi ly trích giúp ta biết được các điều kiện để xác định phương pháp ly trích phù hợp nhằm thu được lượng cao chiết tối ưu (Viện Dược liệu, 2008). Để đánh giá hiệu quả của phương pháp ly trích phù hợp nhằm thu được 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. Trong thí nghiệm, mẫu được ngâm dầm với 7 dung môi khác nhau với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v), kết quả thu được hiệu suất trích cao khi chiết bằng nước lớn nhất với 11,71%, cao methanol 9,12%, ethanol 96 đạt 7,02%, ethanol 70 đạt 6,71%, chloroform 4,74%, ethyl acetate 3,54% và cao petroleum ether cho hiệu suất thấp nhất với 3,28%. Hiệu suất trích này cao hơn so với nghiên cứu của Al-Toubi *et al.* (2013), sử dụng phương pháp soxhlet với dung môi methanol, thu được hiệu suất trích cao lá Sầu Đầu là 5,58%, cao hơn khi trích với chloroform là 0,79% và ethyl acetate là 3,48%. Và cao hơn so với Dineshkumar *et al.* (2010) sử dụng phương pháp ngâm dầm kết hợp với đánh siêu âm ở nhiệt độ phòng để trích cao petroleum ether, chloroform, ethanol và nước lần lượt thu được hiệu suất trích là 0,6%; 1,6%; 2,3% và 2,6%. Điều này được giải thích là do khả năng hòa tan các chất trong dung môi khác nhau là khác nhau và phụ thuộc nhiều vào bản chất của mẫu và của dung môi. Có những chất có thể hòa tan tốt trong dung môi này, nhưng lại kém hòa tan trong dung môi khác. Có những chất hòa tan vừa phải trong 2 dung môi, nhưng lại tan rất tốt trong hỗn hợp của 2 dung môi này,... khả năng hòa tan chất của dung môi dựa vào độ phân cực của dung môi, dung môi phân cực hòa tan các chất phân cực, dung môi có độ phân cực kém hòa tan các chất kém phân cực. Độ phân cực của dung môi được đánh giá bằng hằng số điện môi. Hằng số điện môi lớn, dung môi phân cực càng mạnh (Trần Hùng, 2012). Do đó sự khác nhau loại dung môi ly trích, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, bản chất nguyên liệu, phương pháp chiết,... là nguyên nhân ảnh hưởng đến hiệu suất trích khác nhau trong cùng một mẫu.

Kết quả định tính một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết

Các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ cây thảo dược có nhiều tác dụng như là giảm đường huyết, chống đái tháo đường, kháng oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm và chống ung thư... Việc định tính sơ bộ các chất có hoạt tính sinh học trong cây dược liệu là một bước quan trọng trước khi tiến hành nghiên cứu về cây dược liệu, từ đó giúp tìm ra và phát triển các loại thuốc mới có nguồn gốc từ thiên nhiên (Yadav *et al.*, 2014). Theo Sama *et al.* (2012) và Gopinath *et al.* (2013), các loại thực vật có chứa các hợp chất như flavonoid, alkaloid và steroid,... có khả năng ức chế α -glucosidase. Kết quả phân tích định tính cho thấy, trong cao chiết lá Sầu Đầu có sự hiện diện của các hợp chất như flavonoid, tannin, steroid và triterpenoid (Bảng 1). Kết quả này tương ứng với nghiên cứu của Kazeem và đồng tác giả (2013), Prashanth và Krishnaiah (2014) trong lá Sầu Đầu có sự hiện diện của các hợp chất thiên nhiên như: flavonoid, tannin, saponin, triterpenoid, steroid... Nhiều nghiên cứu khác cho thấy các cao chiết thực vật có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase phụ thuộc vào polyphenol (Kwon *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2014). Ngoài ra, flavonoid là một nhóm chính của các hợp chất polyphenol đã được báo cáo là có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase (Kim *et al.*, 2000; Tadera *et al.*, 2006; Williams, 2013). Các nhóm chất trên có hoạt tính ức chế các enzyme trên là do số và vị trí của các nhóm hydroxyl của chúng trong phân tử đã xác định các yếu tố để ức chế enzyme. Từ việc định tính sơ bộ cho thấy trong lá cây Sầu Đầu cũng chứa nhiều các nhóm hợp chất có tiềm năng sinh học.

Bảng 1. Định tính một số hợp chất trong các loại cao chiết lá Sầu Đầu (Yadav *et al.*, 2014)

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng	Kết quả phân tích
Flavonoid	1 ml dịch trích + 1 ml Pb(OAc) ₄ 10%	Xuất hiện kết tủa màu vàng	+
Triterpenoid	1 mL dịch trích + vài giọt thuốc thử Salkowski	Xuất màu đỏ đậm, xanh hay xanh – tím	+
Steroid (Thuốc thử Salkowski)	1 ml dịch trích + 2 ml CHCl ₃ + 2 ml H ₂ SO ₄ đậm đặc	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp	+
Tannin (Thuốc thử Braymer)	0,5 mL dịch trích + 10 mL H ₂ O + 2-3 giọt FeCl ₃ 0,1%	Xuất hiện xanh dương đen	+

Ảnh hưởng của nồng độ cao chiết lá Sầu Đầu đến khả năng ức chế enzyme α -glucosidase

Trong cơ thể, màng tế bào ruột non tiết ra enzym α -glucosidase thủy phân các oligosaccharit thành glucose và thẩm thấu vào máu qua màng ruột non để nuôi các tế bào của cơ thể. Khi cơ thể bị rối loạn chuyển hóa carbohydrat, lượng đường trong máu sẽ tăng cao, do đó dẫn đến bệnh tiểu đường. Bằng cách ức chế hoạt động của enzym α -glucosidase có thể làm chậm quá trình thủy phân của carbohydrat và làm giảm lượng đường trong máu (Nguyễn Thy Khuê *et al.*, 2006). Các nhà khoa học đã tìm thấy nhiều hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase như: flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid, curcuminoid, phenolic... (Kumar *et al.*, 2011).

Acarbose được biết đến là thuốc thương mại được sử dụng phổ biến trong điều trị ĐTĐ type 2. Để đánh giá tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase, các nhà nghiên cứu thường so sánh với một đối chứng có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase (đối chứng dương). Acarbose là chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase và thường được sử dụng như nghiệm thức đối chứng trong các thí nghiệm khảo sát sự ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase. Phần trăm ức chế enzyme α -glucosidase thể hiện cao nhất ở nồng độ acarbose 500 $\mu\text{g/mL}$ (đạt $86,63 \pm 0,17\%$) và thấp nhất ở nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$ (đạt $15,98 \pm 0,13\%$) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nồng độ còn lại (Bảng 2).

Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết lá Sầu Đâu thể hiện thấp nhất ở nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$ với phần trăm ức chế của cao chiết ethanol 70, ethanol 96, methanol, nước, chloroform, petroleum ether và ethyl acetate đạt lần lượt là $12,29 \pm 0,04$; $12,99 \pm 0,24$, $15,54 \pm 0,34$, $9,18 \pm 0,34$, $17,68 \pm 3,88$, $7,76 \pm 0,16$ và $8,49 \pm 0,18\%$, phần trăm ức chế tiếp tục tăng dần trong dãy nồng độ từ 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 và 450 $\mu\text{g/mL}$ và các nghiệm thức đều khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 3). Cao chiết ethanol 70, ethanol 96, methanol, chloroform đều có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase và hiệu quả ức chế đạt cao hơn đối chứng acarbose. Hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase của cao methanol, ethanol 96, ethanol 70 và chloroform đạt giá trị IC_{50} lần lượt 197,2 $\mu\text{g/mL}$, 174,4 $\mu\text{g/mL}$, 160,1 $\mu\text{g/mL}$, 142,0 $\mu\text{g/mL}$. Cao chiết ethanol 70, ethanol 96, methanol, phần trăm ức chế α -glucosidase tăng dần với các nồng độ 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 và 450 $\mu\text{g/mL}$. Ở mức nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt đạt $12,29 \pm 0,04$; $12,99 \pm 0,24$; $15,54 \pm 0,34\%$ và tăng dần ở nồng độ 450 $\mu\text{g/mL}$ đạt $91,39 \pm 0,04$; $92,51 \pm 0,13$; $93,86 \pm 0,19\%$, tuy nhiên, ở mức nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$ hiệu quả ức chế có xu hướng giảm. Cao chiết petroleum ether, ethyl acetate và nước cũng có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase, tuy nhiên hiệu quả ức chế thấp hơn đối chứng acarbose. Cao chiết petroleum ether, ethyl acetate và nước, phần trăm ức chế α -glucosidase tăng dần với các nồng độ 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 và 450 $\mu\text{g/mL}$. Ở mức nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$ lần lượt đạt $7,76 \pm 0,16$; $8,49 \pm 0,18$; $9,18 \pm 0,34\%$ và tăng dần ở nồng độ 450 $\mu\text{g/mL}$ đạt $77,4 \pm 0,28$; $84,76 \pm 0,24$; $85,42 \pm 0,33\%$. Tuy nhiên, ở mức nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$, hiệu quả ức chế hầu hết các cao chiết có xu hướng giảm. Điều này cho thấy, có thể là do ái lực liên kết của chất ức chế với đối tượng liên kết của chúng là enzyme, cơ chất hoặc phức hợp enzyme - cơ chất không hoàn toàn chặt chẽ và đạt lý tưởng là 100%. Vì vậy, đến một thời điểm nhất định, hiệu suất của phản ứng ức chế sẽ đạt cực đại dù tiếp tục tăng thêm nồng độ chất ức chế.

Bảng 2. Kết quả ức chế enzyme α -glucosidase của acarbose và các loại cao chiết với dung môi khác nhau của lá Sầu Đâu

Nồng độ cao chiết ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế enzyme α -glucosidase (%)							
	Acarbose	Ethanol 70%	Ethanol 96%	Methanol	Nước	Chloroform	Petroleum ether	Ethyl acetate
0	0 ^l	0 ^k	0 ^l	0 ^l	0 ^l	0 ^l	0 ^k	0 ^k
25	15,98 ^k $\pm$ 0,13	12,29 ^j $\pm$ 0,04	12,99 ^k $\pm$ 0,24	15,54 ^k $\pm$ 0,34	9,18 ^k $\pm$ 0,34	17,68 ⁿ $\pm$ 3,88	7,76 ^j $\pm$ 0,16	8,49 ^j $\pm$ 0,18
50	22,15 ^l $\pm$ 0,02	20,52 ^l $\pm$ 0,27	20,41 ^l $\pm$ 0,03	23,57 ^l $\pm$ 0,20	16,28 ^l $\pm$ 0,20	25,75 ^q $\pm$ 0,11	14,18 ^l $\pm$ 0,15	16,25 ^l $\pm$ 0,34
100	31,24 ^l $\pm$ 0,21	37,58 ⁿ $\pm$ 0,28	29,05 ^l $\pm$ 0,08	30,63 ^l $\pm$ 0,16	26,16 ^l $\pm$ 0,29	38,44 ^q $\pm$ 0,17	19,93 ^l $\pm$ 0,26	30,41 ⁿ $\pm$ 0,18
150	37,97 ⁿ $\pm$ 0,12	48,41 ^q $\pm$ 0,23	47,48 ⁿ $\pm$ 0,21	41,50 ⁿ $\pm$ 0,09	37,18 ⁿ $\pm$ 0,01	55,08 ^r $\pm$ 0,08	32,06 ^q $\pm$ 0,18	38,52 ^q $\pm$ 0,26
200	47,53 ^q $\pm$ 0,19	63,08 ^r $\pm$ 0,04	52,26 ^q $\pm$ 0,37	55,46 ^q $\pm$ 0,24	50,11 ^q $\pm$ 0,27	70,41 ^d $\pm$ 0,09	50,08 ^r $\pm$ 0,25	45,15 ^r $\pm$ 0,29
250	55,88 ^r $\pm$ 0,04	70,94 ^r $\pm$ 0,64	70,81 ^r $\pm$ 0,15	63,63 ^r $\pm$ 0,23	54,68 ^r $\pm$ 0,19	83,15 ^c $\pm$ 0,06	55,48 ^r $\pm$ 0,09	57,14 ^r $\pm$ 0,27
300	66,36 ^r $\pm$ 0,17	81,41 ^d $\pm$ 0,16	79,71 ^r $\pm$ 0,25	70,71 ^r $\pm$ 0,16	60,13 ^r $\pm$ 0,14	91,36 ^b $\pm$ 0,12	64,07 ^d $\pm$ 0,43	55,65 ^d $\pm$ 0,16
350	77,35 ^d $\pm$ 0,07	82,16 ^c $\pm$ 0,10	82,81 ^d $\pm$ 0,19	80,65 ^d $\pm$ 0,24	74,03 ^d $\pm$ 0,22	92,23 ^{ab} $\pm$ 0,18	70,58 ^c $\pm$ 0,17	77,68 ^c $\pm$ 0,11
400	79,22 ^c $\pm$ 0,17	82,76 ^c $\pm$ 0,21	86,49 ^c $\pm$ 0,06	87,81 ^c $\pm$ 0,13	77,78 ^c $\pm$ 0,21	92,82 ^{ab} $\pm$ 0,08	77,75 ^b $\pm$ 0,24	81,29 ^b $\pm$ 0,24
450	84,94 ^b $\pm$ 0,13	91,39 ^a $\pm$ 0,04	92,51 ^a $\pm$ 0,13	93,86 ^a $\pm$ 0,19	85,42 ^a $\pm$ 0,33	93,17 ^{ab} $\pm$ 0,11	77,4 ^b $\pm$ 0,28	84,76 ^a $\pm$ 0,24
500	86,63 ^a $\pm$ 0,17	84,55 ^b $\pm$ 0,24	87,52 ^b $\pm$ 0,10	91,34 ^b $\pm$ 0,16	80,68 ^b $\pm$ 0,17	95,36 ^a $\pm$ 0,03	80,07 ^a $\pm$ 0,09	81,67 ^b $\pm$ 0,13

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% theo phép thử Tukey.

Từ kết quả khảo sát khả năng ức chế 50% enzyme α -glucosidase ở các cao so với acarbose khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%. Tuy nhiên, cao ethyl acetate, cao nước, cao petroleum ether có khả năng ức chế thấp hơn so với acarbose (Bảng 2). Cụ thể, được thể hiện thông qua giá trị IC_{50} của 3 loại cao chiết ethyl acetate, cao nước, cao petroleum ether lá Sầu Đâu lần lượt đều cao hơn khoảng 1,04; 1,07 và 1,08 lần so với acarbose (giá trị IC_{50} càng cao thì hiệu quả ức chế càng thấp và ngược lại). Điều này có nghĩa là cao ethyl acetate, cao nước, cao petroleum ether lá Sầu Đâu có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase yếu hơn so với acarbose. Có thể giải thích là do trong lá Sầu Đâu chứa rất ít các hợp chất đối với dung môi có tính không phân cực như petroleum ether, có tính khá phân cực với ethyl acetate và dung môi có tính phân cực cao như nước. Đối với cao chloroform có hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase cao nhất với IC_{50} là 142,0 $\mu\text{g/L}$, tiếp đến là cao ethanol 70 với IC_{50} đạt 160,1 $\mu\text{g/mL}$, cao ethanol 96 với IC_{50} là 174,4 $\mu\text{g/mL}$, cao methanol với IC_{50} là 197,2 $\mu\text{g/mL}$, cao ethyl acetate với IC_{50} 228,4 $\mu\text{g/mL}$, cao nước với IC_{50} là 235,8 $\mu\text{g/mL}$ và thấp nhất là cao ether dầu hỏa với IC_{50} 237,2 $\mu\text{g/mL}$. Điều này cho thấy, sự hiện diện nhiều các hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trong cao chiết lá Sầu Đâu là những chất có tính phân cực trung bình. Các cao chiết lá Sầu Đâu được chiết bằng nhiều

dung môi có độ phân cực khác nhau, thành phần, lượng chất ức chế và khả năng của mỗi cao tác động lên enzyme α -glucosidase là không giống nhau, vì vậy có sự khác biệt về phần trăm ức chế enzyme trên các cao nghiên cứu. So sánh với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Ý Nhi (2012) cao chiết ethyl acetate lá Sầu Đâu, cho kết quả IC_{50} là 196,57 μ g/mL, thấp hơn kết quả nghiên cứu với IC_{50} cao ethyl acetate lá Sầu Đâu là 228,4 μ g/mL. Kazeem et al.(2013) với cao chiết ethanol và cao nước của lá Sầu Đâu lần lượt đạt giá trị IC_{50} là 8,70 $\pm$ 0,24; 7,25 $\pm$ 0,28 mg/mL. Kết quả nghiên cứu của Adewole et al. (2017) trên cao chloroform với IC_{50} là 76,95 $\pm$ 4,19 μ g/mL, thấp hơn kết quả nghiên cứu với IC_{50} cao chloroform lá Sầu Đâu là 142,0 μ g/mL. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do sự khác nhau về điều kiện địa lý và thời gian thu mẫu, phương pháp trích cao, hóa chất,... có thể ảnh hưởng đến thành phần hoạt chất có trong nguyên liệu.

Bảng 3. Phương trình đường chuẩn, hệ số tuyến tính R^2 và giá trị IC_{50} của Acarbose, 07 loại cao chiết lá sầu đầu đối với enzyme α -glucosidase

Stt	Mẫu thí nghiệm	Phương trình đường chuẩn, R^2	Giá trị IC_{50} (μ g/mL)
1	Cao chiết lá sầu đầu Chloroform	$y = 0,2964x + 7,9079$; $R^2 = 0,983$	142,0 ^a $\pm$ 1,56
2	Cao chiết lá sầu đầu ethanol 70	$y = 0,2812x + 4,9853$; $R^2 = 0,9831$	160,1 ^f $\pm$ 0,63
3	Cao chiết lá sầu đầu ethanol 96	$y = 0,2624x + 4,233$; $R^2 = 0,9809$	174,4 ^e $\pm$ 0,41
4	Cao chiết lá sầu đầu methanol	$y = 0,2069x + 9,1911$; $R^2 = 0,9801$	197,2 ^d $\pm$ 0,14
5	Acarbose	$y = 0,182x + 9,8517$; $R^2 = 0,9772$	220,6 ^c $\pm$ 0,18
6	Cao chiết lá sầu đầu ethyl acetate	$y = 0,195x + 5,4694$; $R^2 = 0,9744$	228,4 ^b $\pm$ 0,56
7	Cao chiết lá sầu đầu nước	$y = 0,185x + 6,3622$; $R^2 = 0,9833$	235,8 ^a $\pm$ 0,56
8	Cao chiết lá sầu đầu petroleum ether	$y = 0,1977x + 3,1181$; $R^2 = 0,9844$	237,2 ^a $\pm$ 0,69

Một số cao chiết thực vật cũng đã được khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase như cao chiết ethanol *Mangifera indica* ($IC_{50} = 314$ mg/mL) (Prashanth et al., 2001); cao chiết methanol một số cây như *Marsdenia tenacissima*, *Saussurea lappa*, *Zingiber officinale*, *Piper retrofractum* với giá trị IC_{50} lần lượt là 298,43 $\pm$ 4,79; 401,76 $\pm$ 5,17; 650,33 $\pm$ 7,1; 670,24 $\pm$ 32,97 μ g/ml (Bachhawat et al., 2011). *Croton argyratus* Blume. Folium ($IC_{50} = 366,07$ μ g/mL); *Tabernaemontana sphaerocarpa* Blume Folium ($IC_{50} = 554,32$ μ g/mL); *Strophanthus caudatus* (Blume.f.) Kurz Folium ($IC_{50} = 706,81$ μ g/mL) (Elya et al., 2011); *Orthosiphon aristatus* Miq., *Brassica oleracea* L., *Barleria prionitis* L. với giá trị IC_{50} lần lượt là 373,91; 439,38; 501,37 mg/ml (Mun'im et al., 2013). *Tribulus terrestris* và cây đậu gà với IC_{50} tương ứng là $IC_{50}=6,967\pm34,3$ và $2,885\pm85,4$ μ g/ml (Ercan and El, 2016). *Barleria prionitis* L. 501,37 mg/ml, *Brassica oleracea* L. 439,38 mg/ml, *Orthosiphon aristatus* Miq. 373,91 mg/ml (Mun'im et al., 2013). *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Ash ($IC_{50} = 982,13$ μ g/ml (Wongnawa et al., 2014). Kết quả đều cho giá trị IC_{50} cao hơn so với các kết quả trong nghiên cứu. Điều này chứng tỏ rằng cao chiết lá Sầu Đâu có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn các loại cao chiết kể trên.

KẾT LUẬN

Phân tích vùng trình tự gen *rbcl* và khảo sát về hình thái, vi phẫu cây Sầu Đâu đã xác định được đúng tên khoa học của cây Sầu Đâu tại tỉnh An Giang là *Azadirachta indica* A. Juss, họ Meliaceae. Mẫu lá Sầu Đâu có độ ẩm đo được là 7,92% và hiệu suất trích cao giữa các dung môi khác nhau dao động 3,28 - 11,72%. Cao chiết lá Sầu Đâu có chứa các hợp chất như: flavonoid, tannin, steroid và triterpenoid. Cả 7 loại cao chiết lá Sầu Đâu: cao petroleum ether, cao chloroform, cao ethyl acetate, cao ethanol 70, cao ethanol 96, cao methanol và cao nước đều có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là 237,2; 142,0; 228,4; 160,1; 174,4; 197,2 và 235,8 μ g/mL.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang và Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ về kinh phí, thời gian để nhóm thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adewole E, Ojo A, Omoaghe AO, Enye LA, Jamshed I (2017). *In vitro* Enzymatic Assays of *Azadirachta indica* Extract and Identification of Bioactive Compounds using Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer. *Der Pharma Chemica* 10(2): 105-109.
- Al-Toubi WA, Al-Sabahi JN, Hossain MA, Weli AM, Al-Riyami QA (2013). Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of *Omani* neem. *J Taibah Univ Sci* 7(4): 181-188.
- Bachhawat JA, Shihabudeen MS, Thirumurugan K (2011). Screening of fifteen Indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *Int J Pharm Pharm Sci* 3(4): 267-74.
- Dineshkumar B, Mitra A, Manjunatha M (2010). A comparative study of alpha amylase inhibitory activities of common anti-diabetic plants at Kharagpur 1 block. *Int J Green Pharm* 4(2): 115-121.

- Elya B, Basah K, Mun'im A, Yuliastuti W, A Bangun, Septiana EK (2011). Screening of α -Glucosidase Inhibitory Activity from Some Plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *BioMed Res Int* 2012: 1-6.
- Ercan P, El SN (2016). Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase. *Food Chem* 205:163-169.
- Kazeem MI, TV Dansu, Adeola SA (2013). Inhibitory effect of *Azadirachta* sp. A.Juss leaf extract on the activities of α -Amylase and α -Glucosidase. *Pak J Biol Sci* 16: 1358–1362.
- Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharma Rev* 5(9): 19-29.
- Mun'im A, Andriani A, Mahmudah KF, Mashita M (2013). Screening of α -glucosidase inhibitory activity of some Indonesian medicinal plants. *Int J Med Aromatic Plant* 3(2): 144-150.
- Nguyễn Thị Ý Nhi, Trần Lê Quan và Trần Kim Qui (2011). Các hợp chất ức chế enzyme α -glucosidase được cô lập từ lá *Azadirachta indica* A. Juss trồng ở tỉnh ninh thuận. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 14/2: 36-42.
- Prashanth D, Amit A, Samiulla DS, Asha MK, Padmaja R (2001). α -Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. *Fitoterapia* 72(6): 686-688.
- Prashanth GK, Krishnaiah G M (2014). Chemical composition of the leaves of *Azadirachta indica* Linn (Neem). *International J Adv Engin Technol Manage Appl Sci* 1: 21-31.
- Qaisar MN, Chaudhary BA, Sajid MU, Hussain N (2014). Evaluation of α -glucosidase inhibitory activity of dichloromethane and methanol extracts of *Croton bonplandianum* Baill. *Trop J Pharm Res* 13/11: 1833-1836.
- Trần Hùng (2012). *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*. Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh: 105-127.
- Wongnawa M, Tohkayomatee R, Bumrungwong N, Wongnawa S (2014). Alpha-glucosidase inhibitory effect and inorganic constituents of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. ash. *Songklanakarin J Sci Technol* 36(5): 541-546.
- Yadav M, Chatterji S, Gupta SK and Watal G (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *Int J Pharma Pharma Sci* 6(5): 539-542.

EVALUATION OF INHIBITORY EFFECTS OF *Azadirachta*. sp LEAVES EXTRACT ON α -GLUCOSIDASE ACTIVITY

Lam Bao Nhu Phuong¹, Duong Xuan Chu², Nguyen Thi Ngoc Van²,
 Nguyen Pham Tuan¹ và Nguyen Pham Tu¹

¹ Biotechnology An Giang center

² Can Tho University of Medicine and Pharmacy

SUMMARY

Type 2 diabetes is an uncontrolled, multi-cause metabolic disorder, characterized by chronic hyperglycemia and metabolic disorders such as carbohydrate, lipid, insulin deficiency...cause serious complications. Controlling diabetic conditions by inhibiting carbohydrate-digesting enzymes α -glucosidase is a therapeutic approach which has been used widely for stabilizing postprandial hyperglycemia. Therefore, this study aimed for the purpose of identifying the species correctly, to evaluate the inhibitor of α -glucosidase activities from *Azadirachta* sp. extracts *in vitro*. The results of the study had collected and analyzed to initially determine the correct scientific name of Sầu Dầu in Le Tri Commune, Tri Ton District, An Giang Province is *Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae by observing the morphological characteristics and comparing *rbcL* sequences with 99% similarity in Genbank. All seven *Azadirachta indica* A. Juss. leaf extracts had the α -glucosidase inhibitory activity with the highest IC₅₀ value in chloroform extract with an IC₅₀ of 142.0 μ g/mL, followed by ethanol 70 extract, ethanol 96 extract, methanol extract, water extract, ethyl acetate extract and lowest in petroleum ether extract with IC₅₀ of 160.1 μ g/mL; 174.4 μ g/mL; 197.2 μ g/mL; 228.4 μ g/mL; 237.2 μ g/mL; and 235.8 μ g/mL respectively.

Keywords: α -glucosidase, *Azadirachta indica* A. Juss. Leaves, Lineweaver-Burk, Type 2 Diabetes Mellitus.