

XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -amylase VÀ α -glucosidase CỦA CAO CHIẾT NƯỚC CỎ SỮA LÁ LỚN (*Euphorbia hirta* L.)

*Nguyễn Mạnh Thắng¹, Nguyễn Công Khẩn², Trương Tuyết Mai³
Lê Thị Hồng Hảo⁴, Nguyễn Thị Hồng Ngọc⁴, Trần Hùng Sơn⁴*

Cỏ sữa lá lớn (*Euphorbia hirta* L.) là dược liệu có tác dụng giảm chỉ số đường huyết, được sử dụng trong phòng và chữa bệnh đái tháo đường nhờ khả năng ức chế hoạt tính của hai enzyme thủy phân tinh bột trong cơ thể người là α -amylase và α -glucosidase. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase in vitro của cao chiết nước cỏ sữa lá lớn được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV – VIS. Kết quả: Cao chiết nước cỏ sữa lá lớn có khả năng ức chế enzyme α -amylase (IC₅₀ = 967 μ g/mL) và ức chế enzyme α -glucosidase (IC₅₀ = 53,96 μ g/mL). Đồng thời, khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase có mối quan hệ tương quan với hàm lượng flavonoid tổng trong cao chiết nước cỏ sữa lá lớn, với giá trị IC₅₀ tương ứng lần lượt là 17,6 μ g/mL và 0,982 μ g/ml.

Từ khóa: *Cỏ sữa lá lớn, Đái tháo đường, Flavonoid, Ức chế α -amylase; Ức chế α -glucosidase.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ sữa lá lớn (CSLL) có tên khoa học *Euphorbia hirta* L., thuộc họ thầu dầu (Euphorbiaceae). Thành phần chính của CSLL gồm có: flavonoids; polyphenol; tannins và các triterpenes và phytosterol [1]. Theo kinh nghiệm dân gian, lá cây CSLL được sử dụng để chữa các bệnh về đường tiêu hóa như tiêu chảy, kiết lỵ, viêm ruột, nhiễm khuẩn ruột; các bệnh về đường hô hấp như ho, hen, viêm phế quản; các bệnh về đường niệu sinh dục như bệnh lậu, viêm thận, viêm bể thận. Nhiều công trình trên thế

giới đã chứng minh cây CSLL trong phòng và chữa bệnh đái tháo đường và tác dụng chống oxy hóa trên chuột đái tháo đường [2, 3, 4]. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có cơ sở khoa học chứng minh tác dụng của cỏ CSLL đối với việc giảm làm giảm chỉ số đường huyết ở chuột bị gây đái tháo đường ở qui mô thực nghiệm. Do vậy, với mục đích nhằm cung cấp thêm những bằng chứng khoa học về giá trị sử dụng của loài cây thuốc này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao chiết CSLL.

¹Vụ KHCN – Bộ Công thương
Email: thangngm@moit.gov.vn

²Cục KHCN – Bộ Y tế

³Viện Dinh dưỡng

⁴Viện KNATVSTP quốc gia

Ngày gửi bài: 1/9/2020

Ngày phản biện đánh giá: 1/10/2020

Ngày đăng bài: 20/11/2020

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Sau khi trực tiếp khảo sát thực tế nguồn cỏ sữa lá lớn phát triển tự nhiên tại Bình Dương, tác giả đã thu hái cỏ sữa lá lớn tươi (nguyên rễ), rửa sạch và vận chuyển ra Hà Nội để tiến hành các thí nghiệm. Tác giả đã thực hiện điều chế cao chiết nước tại khoa hóa Thực vật thuộc Viện Dược liệu, được mô tả tóm tắt như sau: 2 kg dược liệu (độ ẩm 8 %), được xay nhỏ, chiết 3 lần bằng nước với tỷ lệ: 12 lít: 10 lít : 10 lít ở nhiệt độ 90-95°C. Thời gian chiết lần lượt là 2 h; 1,5 h và 1 h. Các dịch chiết được lọc sau đó cô cách thủy đến cạn. Tiếp tục sấy bằng tủ sấy chân không đến cao khô. Hiệu suất chiết là 19,4 %.

2.2. Hóa chất và dụng cụ thí nghiệm

Hóa chất: Cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7) (Hãng Megazyme); Cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) (Sigma); Natri cacbonat (Merck); Tri-natri photphat (Megazyme); Natri đihidrophotphat (Merck); Axit clohidric (Merck); Methanol (Merck); Nước cất hai lần.

Dụng cụ: Ống ly tâm dung tích 15 ml, 50 ml; Bình định mức 100 ml; Micropipet 200 μ l, 500 μ l, 1000 μ l.

Thiết bị: Máy quang phổ UV-VIS, đặt ở bước sóng 400 nm; Cuvet thạch anh, 1 cm; Bể ôn nhiệt, 40 \square 0,1°C; Máy đo pH; Máy ly tâm; Cân phân tích, độ chính xác 0,001 g; Đồng hồ bấm giờ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase trong phòng thí nghiệm [5]

- Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác khoảng 0.5 g cao cỏ sữa lá lớn vào ống ly tâm dung tích 50 ml. Thêm 30 ml dung môi chiết (Methanol: Nước = 75 : 25) vào ống ly tâm, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức dung tích 100 ml. Tiến hành chiết lặp lại tương tự hai lần, sau đó gộp dịch chiết. Định mức đến vạch bằng dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25). Lọc, thu lấy dịch trong. Tiến hành pha loãng mẫu thử ở 6 độ pha loãng khác nhau (5; 10; 20; 50; 100; 200) và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme.

- Hoạt tính ức chế α -Amylase được xác định dựa trên phương pháp sử dụng cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7).

- Cách tiến hành:

Cho 200 μ l mẫu dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn vào ống nghiệm chứa 200 μ l enzyme α -Amylase (1.0 U/ml) trong đệm photphat 0,1M pH 6,9. Ống nghiệm được ủ ở 40°C trong 5 phút. Thêm 200 μ l cơ chất Blocked p-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7). Ủ ở 40°C trong chính xác 10 phút. Thêm 3,0 mL dung dịch Tri-natri photphat pH 11,0 vào ống nghiệm để dừng phản ứng. Đo độ hấp thụ của mẫu thử ở bước sóng 400 nm bằng máy quang phổ UV-VIS.

Tiến hành song song với mẫu kiểm soát và mẫu trắng. Trong đó mẫu kiểm soát chứa 200 μ l dung dịch đệm thay cho mẫu thử, và mẫu trắng chứa 200 μ l dung dịch đệm thay cho enzyme.

- Tính kết quả:

Hoạt tính ức chế enzyme được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế (\%)} = (\text{AControl} - [\text{ATest} - \text{ABlank}]) / \text{AControl} \times 100$$

Trong đó:

AControl: Độ hấp thụ của mẫu kiểm soát

ATest: Độ hấp thụ của mẫu thử

ABlank: Độ hấp thụ của mẫu trắng

- Khả năng ức chế enzyme được xác định thông qua chỉ số IC50. IC50 được định nghĩa là nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) của mẫu khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme.

2.3.2. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trong phòng thí nghiệm [6]

- Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác khoảng 0.5 g cao cỏ sữa lá lớn vào ống ly tâm dung tích 50 ml. Thêm 30 ml dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25) vào ống ly tâm, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức dung tích 100 ml. Tiến hành chiết lặp lại tương tự hai lần, sau đó gộp dịch chiết. Định mức đến vạch bằng dung môi chiết (Methanol : Nước = 75 : 25). Lọc, thu lấy dịch trong. Tiến hành pha loãng mẫu thử ở 6 độ pha loãng khác nhau (5; 10; 20; 50; 100; 200) và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme.

- Hoạt tính ức chế α -glucosidase được xác định dựa trên phương pháp sử dụng cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG).

- Cách tiến hành:

Cho 500 μl mẫu dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn vào ống nghiệm chứa 500 μl enzyme α -glucosidase (0,1 U/ml) trong

đệm photphat 0,1M pH 6,8. Ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 10 phút. Thêm 500 μl cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) 2,5mM. Ủ ở 37°C trong chính xác 20 phút. Thêm 1,0 ml dung dịch Na_2CO_3 0,2M vào ống nghiệm để dừng phản ứng. Đo độ hấp thụ của mẫu thử ở bước sóng 405 nm bằng máy quang phổ UV-VIS.

Tiến hành song song với mẫu kiểm soát và mẫu trắng. Trong đó mẫu kiểm soát chứa 500 μL dung dịch đệm thay cho mẫu thử, và mẫu trắng chứa 500 μL dung dịch đệm thay cho enzyme.

- Tính kết quả:

Hoạt tính ức chế enzyme được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế (\%)} = (\text{AControl} - [\text{ATest} - \text{ABlank}]) / \text{AControl} \times 100$$

Trong đó:

AControl: Độ hấp thụ của mẫu kiểm soát

ATest: Độ hấp thụ của mẫu thử

ABlank: Độ hấp thụ của mẫu trắng

Khả năng ức chế enzyme được xác định thông qua chỉ số IC50. IC50 được định nghĩa là nồng độ ($\mu\text{g/ml}$) của mẫu khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase trong phòng thí nghiệm

Tiến hành đánh giá thử hoạt tính của mẫu cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau, kết quả thu được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau

C ($\mu\text{g/ml}$)	C-Fla ($\mu\text{g/ml}$)	Abs (Control)	Abs (Test)	TB	Abs (Blank)	TB	% Inh
5000	91,00	1,214	0,836	0,837	0,633	0,631	83,00
			0,842		0,630		
			0,833		0,629		
1000	18,20	1,214	0,744	0,747	0,152	0,155	51,21
			0,747		0,160		
			0,750		0,152		
500	9,10	1,214	0,938	0,943	0,131	0,129	32,89
			0,944		0,120		
			0,948		0,135		
250	4,55	1,214	0,984	0,982	0,103	0,102	27,51
			0,985		0,097		
			0,978		0,107		
100	1,82	1,214	0,984	0,990	0,094	0,093	26,11
			0,997		0,089		
			0,990		0,097		
50	0,91	1,214	1,066	1,066	0,093	0,094	19,93
			1,045		0,089		
			1,086		0,099		

Chú thích:

C ($\mu\text{g/ml}$): Nồng độ cao cỏ sữa lá lớn

C-Fla ($\mu\text{g/ml}$): Nồng độ flavonoid tương ứng trong cao

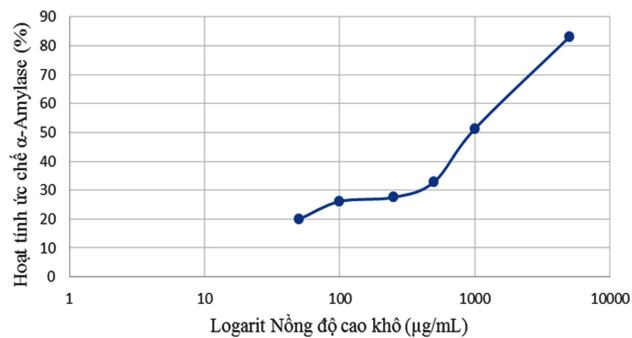
Abs (Control): Độ hấp thụ quang của ống kiểm soát

Abs (Test): Độ hấp thụ quang của ống thử

Abs (Blank): Độ hấp thụ quang của ống trắng

Inh (%): Hoạt tính ức chế enzyme α -Amylase

Đồ thị liên hệ giữa nồng độ cao khô và hoạt tính ức chế enzyme α -Amylase



Hình 1. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau

Các nồng độ khác nhau của dịch chiết cao cỏ sữa lá lớn được thêm vào phản ứng giữa enzyme và cơ chất Blocked p-nitro-phenyl maltoheptaoside (BPNPG7). Đối với mẫu thử không pha loãng, hoạt tính ức chế đạt 83,0%, trong khi đó khi pha

loãng mẫu thử 200 lần, hoạt tính ức chế chỉ còn 19,9%. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi nồng độ dịch chiết cao càng lớn, lượng PNP tự do tạo thành càng nhỏ, điều này cho thấy khả năng ức chế enzyme α -Amylase càng cao.

Giá trị IC₅₀ được xác định:

$y = ax + b$	Hàm lượng cao	Hàm lượng Flavonoid toàn phần
a =	0,037	2,013
b =	14,580	14,580
IC₅₀ (μg/ml)	967,016	17,600

Dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế enzyme α -amylase, giá trị IC₅₀ được xác định là 967 μ g/ml.

3.2. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase trong phòng thí nghiệm
Tiến hành đánh giá thử hoạt tính của mẫu cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau.

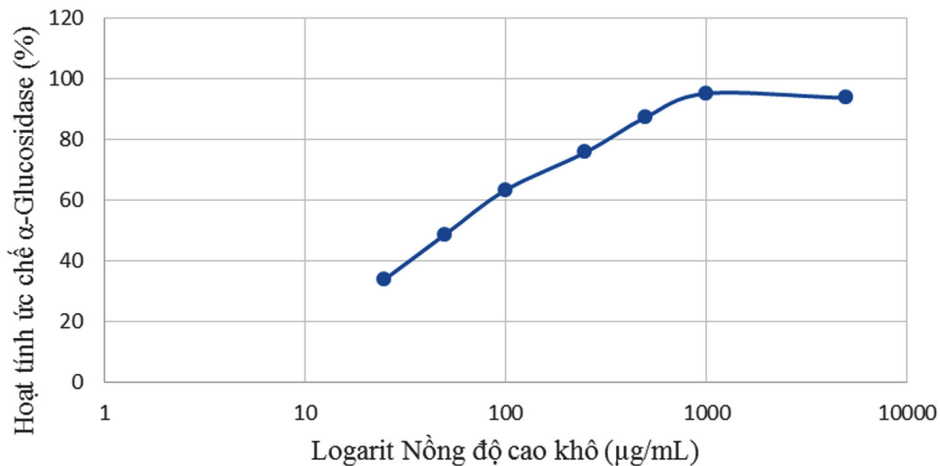
Bảng 2. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau

C (μ g/ml)	C-Fla (μ g/ml)	Abs (Control)	Abs (Test)	TB	Abs (Blank)	TB	% Inh
5000	91,00	1,803	2,061	2,026	1,924	1,913	93,77
			2,004		1,905		
			2,012		1,911		
1000	18,20	1,803	0,494	0,493	0,407	0,408	95,25
			0,501		0,406		
			0,485		0,410		
500	9,10	1,803	0,443	0,439	0,212	0,213	87,47
			0,452		0,210		
			0,422		0,217		
250	4,55	1,803	0,528	0,522	0,085	0,087	75,89
			0,517		0,087		
			0,520		0,089		
100	1,82	1,803	0,730	0,722	0,058	0,063	63,43
			0,714		0,063		
			0,722		0,067		
50	0,91	1,803	0,973	0,962	0,038	0,040	48,84
			0,955		0,039		
			0,958		0,042		
25	0,46	1,803	1,206	1,211	0,023	0,021	34,04
			1,194		0,022		
			1,232		0,019		

Chú thích:

<i>C (μg/ml):</i>	<i>Nồng độ cao cỏ sữa lá lớn</i>
<i>C-Fla (μg/ml):</i>	<i>Nồng độ flavonoid tương ứng trong cao</i>
<i>Abs (Control):</i>	<i>Độ hấp thụ quang của ống kiểm soát</i>
<i>Abs (Test):</i>	<i>Độ hấp thụ quang của ống thử</i>
<i>Abs (Blank):</i>	<i>Độ hấp thụ quang của ống trắng</i>
<i>Inh (%):</i>	<i>Hoạt tính ức chế enzyme α-Glucosidase</i>

Đồ thị liên hệ giữa nồng độ cao khô và hoạt tính ức chế enzyme α-Glucosidase



Hình 2. Hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase của cao CSLL ở các độ pha loãng khác nhau

Các nồng độ khác nhau của dịch chiết cao Cỏ sữa lá lớn được thêm vào phản ứng giữa enzyme và cơ chất PNPG. Đối với mẫu thử không pha loãng, hoạt tính ức chế đạt 93,8%, trong khi đó khi pha loãng mẫu thử

200 lần, hoạt tính ức chế chỉ còn 34,0%. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi nồng độ dịch chiết cao càng lớn, lượng PNP tự do tạo thành càng nhỏ, điều này cho thấy khả năng ức chế enzyme α-Glucosidase càng mạnh.

$y = ax + b$	Hàm lượng cao	Hàm lượng Flavonoid toàn phần
a =	0,292	16,029
b =	34,258	34,258
IC₅₀ (μg/ml)	53,961	0,982

Dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase, giá trị IC₅₀ được xác định là 53,96 μg/ml.

IV. KẾT LUẬN

IC₅₀ được định nghĩa là nồng độ ($\mu\text{g/ml}$) của mẫu thử khảo sát có thể ức chế 50% hoạt tính của enzyme, mẫu có hoạt tính ức chế càng cao thì giá trị IC₅₀ càng thấp. Dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính ức chế, khả năng ức chế hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC₅₀ tương ứng được xác định lần lượt là 967 $\mu\text{g/ml}$ và 53,96 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả cho thấy khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao chiết CSLL đều rõ rệt, đặc biệt là α -glucosidase. Điều này mở ra triển vọng sản xuất các sản phẩm từ cỏ sữa lá lớn ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hollman PCH and Arts ICW (2000). *Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden*. J Sci Food Agric. 80: 1081-1093.
- Kumar S, et al. (2010). *Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of Euphorbia hirta stem extract*. International Research Journal of Pharmacy 1:150-156.
- Tamboli P, Patil P, Patil V., Surana S (2008). *Hypoglycemic and anti diabetic effect of ethanolic extract of Euphorbia hirta Linn*. R.C. Patel Institute of Pharmaceutical Education and Research, 1:159.
- Subramanian SP, Bhuvaneshwari S, Prasad GS (2011). *Antidiabetic and antioxidant potentials of Euphorbia hirta leaves extract studied in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats*. Gen Physiol Biophys. 30(3):278-285.
- AOAC (2002). *AOAC Official Method 2002.01 Measurement of α -Amylase Activity in White Wheat Flour, Milled Malt, and Microbial Enzyme Preparations*.
- Manjur Ali Sheliya và các cộng sự. (2016). *In vitro α -glucosidase and α -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of Euphorbia hirta L*. Drug Development and Therapeutics 7(1), tr. 26-30.

Summary

DETERMINING INHIBITORY ACTIVITY OF α -AMYLASE AND α -GLUCOSIDASE ENZYMES OF EUPHORBIA HIRTA L. EXTRACT

Euphorbia hirta L. (Cỏ sữa lá lớn – CSLL) is a herbal medicine that could reduce the glycaemic index. It is used in the prevention and treatment of diabetes thanks to its ability to inhibit the activity of two starch hydrolyzate enzymes in human body, which are α -amylase and α -glucosidase. The inhibitory activity of inhibiting enzymes (α -amylase and α -glucosidase) in vitro of CSLL extract was determined by UV-VIS molecular absorption spectroscopy. The results of the study showed that extract of *Euphorbia hirta* L. was able to inhibit α -amylase enzyme (IC₅₀ = 967 $\mu\text{g/ml}$) and inhibit α -glucosidase enzyme (IC₅₀ = 53.96 $\mu\text{g/ml}$). At the same time, the study results also showed that inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes was correlated with total Flavonoid content in extract of *Euphorbia hirta* L., with IC₅₀ value of 17.6 and 0.982 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Keywords: *Eucalyptus*, *Diabetes*, *Flavonoid*, *α -amylase inhibitor*; *α -glucosidase inhibitor*.