Tác dụng ức chế *α*-glucosidase và kháng oxy hóa *in vitro* của các cao chiết phối hợp từ chùm ngây (*Moringa oleifera*), lá đắng (*Vernonia amygdalina*) và rau má (*Centella asiatica*)

Lê Thị Kim Oanh, Nguyễn Lan Chi, Lý Hải Triều và Lê Văn Minh*
Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh - Viện Dược liệu

TÓM TẮT
Nghiên cứu này khảo sát tác dụng ức chế α-glucosidase và kháng oxy hóa in vitro của các công thức phối hợp từ lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má. Kết quả cho thấy công thức được phối từ cao chiết ethanol 45% riêng lẻ ở tỷ lệ 1 chùm ngây: 1 lá đắng: 3 rau má có tác dụng ức chế α-glucosidase tốt hơn các công thức phối hợp khác và cũng có khả năng kháng oxy hóa theo cơ chế bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} lần lượt là 275.12 µg/mL và 110.69 µg/mL. Công thức phối hợp này thể hiện tương tác hiệp đồng ở cả tác dụng ức chế α-glucosidase và bắt gốc tự do DPPH. Vì vậy, công thức phối hợp tối ưu này cần được tiếp tục nghiên cứu trên các tác dụng dược lý in vivo để phát huy các đặc tính dược lý tốt của cả ba dược liệu này.

Từ khóa: *chùm ngây, lá đắng, rau má, ức chế α-glucosidase, kháng oxy hóa*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường đang trở thành mối quan tâm lớn của cộng đồng do ảnh hưởng đến sức khỏe và chi phí điều trị cao. Trong đó, đái tháo đường loại 2 chiếm khoảng 90% các trường hợp với đặc trưng là tăng đường huyết sau ăn liên quan đến thiếu hụt insulin, đề kháng insulin hoặc cả hai. Một trong những chiến lược điều trị là sử dụng các chất ức chế *α*-glucosidase - enzyme xúc tác chuyển hóa các carbohydrat phức tạp thành các monosaccharid đơn giản dễ hấp thu - góp phần làm giảm hấp thu carbohydrat và giảm tăng đường huyết sau ăn [1]. Một số dược liệu đã được nghiên cứu có tác dụng ức chế *α*-glucosidase như lá cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) [2], lá cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) [3], rau má (*Centella asiatica* (L.) Urban.) [4]. Trong dân gian, lá chùm ngây được sử dụng để chữa một số bệnh liên quan đến tim mạch, đái tháo đường, tê thấp, tiêu hóa, viêm, lợi tiểu, ...; lá cây lá đắng dùng để chữa các bệnh lý về gan, bảo vệ gan, đái tháo đường, ho, sốt, lợi tiểu, táo bón,...; rau má được sử dụng để thanh nhiệt, giải độc, lợi tiểu, tiêu viêm, sát trùng, cầm máu, nhuận gan,... Các nghiên cứu cũng cho thấy cả ba dược liệu này chứa nhiều thành phần hóa học có lợi cho sức khỏe và tác dụng hỗ trợ điều trị nhiều bệnh lý, trong đó có các bệnh lý liên quan đến rối loạn chuyển hóa [5 - 7].

Nghiên cứu này tiếp cận phối hợp ba dược liệu bao gồm lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má dựa trên các cơ sở như ba dược liệu này có tính vị (ngọt, hơi đắng, mát), tác dụng dược lý khá tương tự và chứa nhiều hợp chất tự nhiên có giá trị [5 - 7]; tiềm năng phối hợp của lá cây

Tác giả liên hệ: TS. Lê Văn Minh
Email: lvminh05@gmail.com

chùm ngây và lá cây lá đắng [8], lá chùm ngây và rau má đã được chứng minh [9]; kế thừa các công trình nghiên cứu đã được thực hiện tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM [10 - 12]; những dược liệu này dễ trồng, dễ thu hái, trữ lượng khá ổn định; chưa có công bố liên quan đến phối hợp ba dược liệu này. Chính vì vậy, nghiên cứu này lần đầu tiên phối hợp lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má ở các tỷ lệ và phương thức khác nhau để tìm ra công thức phối hợp tối ưu nhất theo hướng ức chế *α*-glucosidase và kháng oxy hóa, làm tiền đề cho các nghiên cứu kế tiếp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nguyên liệu thực vật: Lá của cây chùm ngây (*Moringa oleifera* Lam.) được thu tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang, lá của cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) được thu tại huyện Tân Thạnh, tỉnh Long An và phần trên mặt đất cây rau má (*Centella asiatica* (L.) Urb.) được thu tại Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu dược liệu nghiên cứu được thu vào tháng 3 năm 2021, tiêu bản được giám định và lưu giữ tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM với các mã số lưu mẫu tương ứng (TTS-MO-005, TTS-VA-006, TTS-CA-007). Các mẫu dược liệu được làm sạch, phơi sấy khô (độ ẩm dưới 13% theo quy định của Dược điển Việt Nam V) và xay thành bột để nghiên cứu.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết lập các công thức phối hợp

Trong giới hạn của nghiên cứu này, để thu được các cao chiết phối hợp từ phương pháp chiết sắc với nước và ngấm kiệt với ethanol 45%, 4 tỷ lệ phối hợp đã được xây dựng một cách tương đối tham khảo từ liều lượng sử dụng trong dân gian: 10 - 20 g lá chùm ngây khô/ngày, 5 - 10 g lá cây lá đắng khô/ngày, 15 - 30 g rau má khô/ngày. Mặt khác, nghiên cứu này cũng tiếp cận phối hợp các dược liệu theo 2 cách để đánh giá được cách phối hợp nào cho kết quả tốt hơn. Thứ nhất, các công thức được phối từ các dược liệu ở dạng khô trước khi chiết xuất, điều này mô phỏng cho phương thức thường được sử dụng trong dân gian. Thứ hai, các công thức được phối sau khi chiết xuất từ các dược liệu riêng lẻ, đây là cách thường được dùng trong nghiên cứu hiện đại. Các công thức cao chiết được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Các cao chiết dược liệu và công thức phối hợp sử dụng trong nghiên cứu

Cao chiết riêng lẻ được chiết từ 100 g nguyên liệu khô	**Công thức phối hợp được chiết từ nguyên liệu khô (*w/w/w*)**	**Công thức phối hợp được phối từ 3 cao chiết riêng lẻ (*w/w/w*)** (tính trên khối lượng cao khô kiệt)
Cao chiết lá chùm ngây (Cao **MO**) Cao chiết lá đắng (Cao **VA**) Cao chiết rau má (Cao **CA**)	Công thức 1 (**CT1**): 2MO: 1VA: 3CA (40 g MO: 20 g VA: 60 g CA) **CT2:** 1MO: 1VA: 3CA (20 g MO: 20 g VA: 60 g CA) **CT3:** 1MO: 1VA: 2CA (25 g MO: 25 g VA: 50 g CA) **CT4:** 2MO: 1VA: 2CA (40 g MO: 20 g VA: 40 g CA)	**CT5:** 2MO: 1VA: 3CA **CT6:** 1MO: 1VA: 3CA **CT7:** 1MO: 1VA: 2CA **CT8:** 2MO: 1VA: 2CA

MO: *Chùm ngây;* ***VA:*** *Lá đắng;* ***CA:*** *Rau má*

2.2.2. Chiết xuất dược liệu

Trong nghiên cứu này, dược liệu được chiết với nước bằng phương pháp sắc để mô phỏng cho phương thức sắc thuốc trong dân gian và chiết với ethanol 45% bằng phương pháp chiết ngấm kiệt từ sự kế thừa các nghiên cứu trước đây tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM [10 - 12].

Chiết ngấm kiệt: Bột dược liệu được chiết bằng

Ethanol 45% ở nhiệt độ phòng, thời gian ngâm chiết là 24 giờ, tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/20 (g/mL). Dịch chiết được rút với tốc độ 2 mL/phút và cô quay chân không dưới áp suất giảm ở 60 - 70°C thu được cao chiết lỏng, cao chiết lỏng tiếp tục được cô trên bếp cách thủy ở 60 - 70°C để thu cao chiết ethanol 45% ở dạng cao đặc.

Chiết sắc: Bột dược liệu được chiết bằng nước cất hai lần ở 100°C trong thời gian 60 phút/lần chiết, thực hiện ba lần chiết để đạt tỷ lệ chiết dược liệu/dung môi là 1/20 (g/mL). Sau mỗi lần chiết gạn lấy dịch chiết, dịch chiết được cô bay hơi dung môi trên bếp cách thủy thu được cao chiết nước.

Các cao chiết được lưu trữ ở 2 - 8°C và hòa tan trong nước cất hai lần để tạo thành dung dịch thử nghiệm.

Công thức tính hiệu suất chiết cao:

$$H\ (\%) = \frac{m \times (1 - a)}{M \times (1 - A)} \times 100$$

Trong đó, H là hiệu suất chiết cao, m là khối lượng cao chiết thu được (g), M là khối lượng bột nguyên liệu khô (g), a là độ ẩm cao chiết (%), A là độ ẩm nguyên liệu (%).

2.2.3. Thử nghiệm ức chế α-glucosidase

Phản ứng ức chế α-glucosidase bởi các mẫu thử được triển khai theo quy trình được mô tả bởi nghiên cứu trước đây [13]. Hỗn hợp phản ứng trong dung dịch đệm phosphat 0.1 M (pH 6.8), bao gồm 60 µL mẫu thử nghiệm hoặc chứng dương ở các nồng độ khác nhau và 50 µL dung dịch đệm có chứa α-glucosidase 0.2 U/mL (từ *Saccharomyces cerevisiae*, loại I, Sigma). Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 10 phút, sau đó thêm 50 µL dung dịch *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranosid (pNPG, Sigma). Hỗn hợp phản ứng tiếp tục được ủ ở 37°C trong 20 phút, sau đó độ hấp thụ quang (A) của hỗn hợp sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm bằng máy đọc đĩa ELISA đa năng (Biotek, USA) và so sánh với một mẫu chứng chứa 60 µL nước cất hai lần thay cho mẫu thử. Acarbose (thuốc ức chế α-glucosidase điển hình, Sigma) và quercetin (một hợp chất tự nhiên, Sigma) được sử dụng làm chứng dương. Phép đo được lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình. Phần trăm ức chế α-glucosidase của mẫu thử được tính theo công thức:

$$I\ (\%) = \frac{(A_c - A_{0c}) - (A_t - A_{0t})}{(A_c - A_{0c})} \times 100$$

Trong đó, I là phần trăm ức chế enzyme; A_c là độ hấp thụ quang của mẫu chứng (có enzyme, không có chất thử; A_{0c} là độ hấp thụ quang của mẫu trắng chứng (không có enzyme, không có chất thử); A_t là độ hấp thụ quang của mẫu thử (có enzyme, có chất thử); A_{0t} là độ hấp thụ quang của mẫu trắng thử (không có enzyme, có chất thử). Bên cạnh đó, giá trị IC - Inhibitory concentration (nếu có) ở các mức 25 - 75% của mẫu thử nghiệm cũng được xác định để đánh giá khả năng ức chế của mẫu.

2.2.4. Thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa *in vitro* của các cao chiết được đánh giá bằng thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) [14]. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 25 µL dịch chiết ở các nồng độ khác nhau, 150 µL methanol (Merck) và 25 µL DPPH 0.6 mM (Sigma) pha trong methanol. Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang của hỗn hợp sau phản ứng được đo ở bước sóng 515 nm. Sử dụng mẫu trắng là methanol. Acid ascorbic (chất ức chế DPPH điển hình, Sigma) và quercetin (một hợp chất tự nhiên, Sigma) được sử dụng làm chứng dương. Phép đo được lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH (HTKO%) được tính theo công thức:

$$HTKO\ (\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100$$

Trong đó, A_0 là độ hấp thụ quang của mẫu chứng (dung dịch DPPH 0.6 mM, không có chất thử); A_1 là độ hấp thụ quang của mẫu có chứa

chất thử và DPPH, A_2 là độ hấp thụ quang của mẫu có chứa chất thử, không có DPPH. Bên cạnh đó, khả năng bắt gốc tự do DPPH cũng được đánh giá thông qua giá trị IC (nếu có) ở các mức 25 - 75%.

2.2.5. Phân tích chỉ số kết hợp

Trong nghiên cứu này, để xác định sự hiệp đồng, cộng gộp hay đối kháng của sự kết hợp giữa lá chùm ngây, lá đắng và rau má trong cùng một thử nghiệm, nguyên tắc hiệu ứng trung vị và chỉ số kết hợp được phát triển bởi Chou và Talalay [15, 16] được sử dụng.

Nguyên tắc hiệu ứng trung vị được xác định bởi: $\log(f_a/f_u) = m\log D - m\log D_m$

Trong đó, D là nồng độ, D_m là nồng độ cần thiết đạt được 50% tác dụng ức chế, f_a và f_u tương ứng là phần bị ảnh hưởng và không bị ảnh hưởng bởi nồng độ D và m là hệ số độ lệch của đường cong tác dụng theo nồng độ, $f_u = 1 - f_a$.

Công thức tính chỉ số kết hợp (CI, Combination index) được thể hiện như sau:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_X)_1} + \frac{(D)_2}{(D_X)_2} + \frac{(D)_3}{(D_X)_3}$$

Trong đó, CI là chỉ số kết hợp của ba thành phần ở mức X%; $(D)_1$, $(D)_2$ và $(D)_3$ là nồng độ tương ứng của ba thành phần trong phối hợp để đạt được X% ức chế; $(D_X)_1$, $(D_X)_2$ và $(D_X)_3$ là nồng độ tương ứng của ba thành phần riêng lẻ để đạt được X% ức chế. Khi giá trị CI < 1 cho thấy tác dụng hiệp đồng (giá trị CI càng gần 0 thì tác dụng hiệp đồng càng mạnh); khi CI = 1 cho thấy tác dụng cộng gộp và CI > 1 là tác dụng đối kháng. Trong giới hạn của nghiên cứu này, hiệp đồng (hoặc đối kháng) có nghĩa là tăng cường (hoặc làm suy giảm) dựa trên phương pháp Chou-Talalay để kết hợp thuốc.

2.2.6. Phân tích dữ liệu

Các số liệu ở các thử nghiệm được lưu trữ và xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2019. Giá trị IC (nếu có) ở các mức được tính dựa trên phương trình thể hiện tương quan giữa nồng độ chất thử nghiệm và phần trăm ức chế enzyme hay gốc tự do. Các số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean ± SEM) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm t-test bằng phần mềm GraphPad Prism 8.0.2 (USA).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chiết xuất dược liệu

Các cao chiết được chuẩn bị từ 3 dược liệu bằng phương pháp chiết sắc và ngấm kiệt đều có độ ẩm đạt yêu cầu theo quy định của Dược điển Việt Nam V (< 20%). Hiệu suất chiết cao được tính theo khối lượng khô kiệt được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chiết xuất dược liệu

Phương pháp	Dược liệu	MO	VA	CA	CT1	CT2	CT3	CT4
Chiết sắc	**Khối lượng nguyên liệu (g)**	100	100	100	120	100	100	100
	Độ ẩm nguyên liệu (%)	7.43	7.80	7.29	7.36	7.38	7.40	7.37
	Khối lượng cao chiết (g)	33.05	24.20	30.03	37.25	30.70	30.97	32.03
	Độ ẩm cao chiết (%)	4.81	6.75	7.63	7.92	7.94	7.29	7.92
	Hiệu suất chiết cao (%)	33.92	24.48	29.92	30.86	30.51	31.01	31.84

Chiết ngấm kiệt	**Khối lượng nguyên liệu (g)**	100	100	100	120	100	100	100
	Độ ẩm nguyên liệu (%)	7.43	7.80	7.29	7.36	7.38	7.40	7.37
	Khối lượng cao chiết (g)	34.81	32.09	36.10	42.09	36.08	35.29	35.11
	Độ ẩm cao chiết (%)	10.85	7.88	8.67	8.97	8.43	8.13	9.10
	Hiệu suất chiết cao (%)	33.52	32.06	35.57	34.47	35.67	35.01	34.45

MO: *Chùm ngây;* ***VA:*** *Lá đắng;* ***CA:*** *Rau má;* ***CT1:*** *2MO:1VA:3CA;* ***CT2:*** *1MO:1VA:3CA;* ***CT3:*** *1MO:1VA:2CA;* ***CT4:*** *2MO:1VA:2CA*

3.2. Tác dụng ức chế α-glucosidase

Trong giới hạn của nghiên cứu này, 22 cao chiết đại diện cho hai phương thức và các tỷ lệ phối trộn khác nhau bước đầu được thăm dò khả năng ức chế α-glucosidase ở một nồng độ phản ứng nhất định (750 µg/mL) để sơ bộ xác định được cao chiết loại nào (cao chiết nước hay cao chiết ethanol 45%) và phương thức phối nào (phối từ nguyên liệu hay phối từ cao chiết) cho cao chiết có khả năng ức chế α-glucosidase tốt hơn.

Bảng 3. Phần trăm ức chế α-glucosidase của các mẫu cao chiết ở nồng độ 750 µg/mL

Mẫu	Tỷ lệ phối trộn	% Ức chế	
		Cao nước	Cao ethanol 45%
MO	MO	9.17 ± 3.51	13.28 ± 0.74
VA	VA	51.45 ± 0.65**	57.51 ± 0.73
CA	CA	28.89 ± 0.19****	78.85 ± 1.05
CT1	2MO: 1VA: 3CA	13.04 ± 3.50**	35.65 ± 0.96
CT2	1MO: 1VA: 3CA	12.96 ± 4.54***	52.94 ± 0.31
CT3	1MO: 1VA: 2CA	13.52 ± 0.90****	50.12 ± 0.36
CT4	2MO: 1VA: 2CA	8.07 ± 1.07*	17.88 ± 1.93
CT5	2MO: 1VA: 3CA	11.78 ± 0.93****	52.34 ± 0.68###
CT6	1MO: 1VA: 3CA	8.96 ± 1.01****	100.00 ± 0.00####
CT7	1MO: 1VA: 2CA	12.60 ± 2.37****	70.31 ± 0.38####
CT8	2MO: 1VA: 2CA	15.24 ± 0.66****	52.62 ± 0.37####

**p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001: khác biệt so với cao ethanol 45% ở cùng công thức.*
###p < 0.001, ####p < 0.0001: khác biệt so với cao ethanol 45% được phối từ nguyên liệu thô ở cùng tỷ lệ.
MO: *Chùm ngây;* ***VA:*** *Lá đắng;* ***CA:*** *Rau má. CT1-4: Phối từ nguyên liệu, CT5-8: Phối từ cao chiết.*

Kết quả cho thấy các cao chiết ethanol 45% thể hiện phần trăm ức chế α-glucosidase ở cùng nồng độ khảo sát cao hơn đáng kể so với các cao chiết nước tương ứng. Trong số các cao chiết ethanol 45%, các công thức được phối từ 3 cao chiết đơn lẻ (CT5, CT6, CT7, CT8) thể hiện khả năng ức chế enzyme này cao hơn đáng kể so với các cao chiết được phối từ 3 nguyên liệu thô (CT1, CT2, CT3, CT4) ở cùng tỷ lệ (Bảng 3). Do đó, nghiên cứu tiếp tục xác định giá trị IC_{50} của 3 cao chiết ethanol 45% đơn lẻ và các cao chiết ethanol 45% được phối từ 3 cao chiết đơn lẻ (CT5, CT6, CT7, CT8) trong tác dụng ức chế α-glucosidase và đánh giá tác dụng của các cao chiết này trong hoạt động kháng oxy hóa theo cơ chế bắt gốc tự do DPPH.

Bảng 4. Các giá trị IC của các mẫu nghiên cứu đối với tác dụng ức chế α-glucosidase

Mẫu	Tỷ lệ phối trộn	Giá trị IC (µg/mL)		
		25%	50%	75%
MO	MO	1,544.15 ± 39.80	2,370.14 ± 11.71	3,196.12 ± 63.00
VA	VA	73.89 ± 2.60	381.34 ± 4.38	1,976.79 ± 117.29
CA	CA	61.03 ± 0.95	201.93 ± 1.46[a]	642.15 ± 17.61
CT5	2MO: 1VA: 3CA	211.39 ± 13.59	695.74 ± 2.43	1,180.09 ± 14.37
CT6	1MO: 1VA: 3CA	81.69 ± 8.28	275.12 ± 4.64[a]	468.56 ± 6.27
CT7	1MO: 1VA: 2CA	195.72 ± 12.96	488.56 ± 7.44	781.40 ± 6.06
CT8	2MO: 1VA: 2CA	209.36 ± 21.79	688.99 ± 0.73	1,168.63 ± 20.34
Acarbose		-	59.56 ± 1.35	-
Quercetin		-	48.12 ± 1.56	-

(-) Không xác định. [a]p < 0.0001: Ở mức 50%, khác biệt đáng kể so với các cao chiết còn lại.
***MO:** Chùm ngây; **VA:** Lá đắng; **CA:** Rau má.*

Từ kết quả giá trị IC_{50} cho thấy cao chiết ethanol 45% đơn lẻ từ rau má có tác dụng ức chế *α*-glucosidase cao hơn đáng kể hai cao chiết đơn lẻ còn lại. Tác động ức chế *α*-glucosidase của các cao chiết phối hợp giảm dần theo thứ tự: CT6 > CT7 > CT8 > CT5 (Bảng 4). Điều này cho thấy công thức phối hợp ở tỷ lệ 1MO: 1VA: 3CA (CT6) thể hiện tác dụng ức chế *α*-glucosidase mạnh hơn các công thức phối hợp khác. Nhìn chung, ở tỷ lệ phối hợp này, cao chiết thể hiện tác dụng ức chế *α*-glucosidase cao hơn cao chiết lá cây chùm ngây (MO) và lá cây lá đắng (VA) đơn lẻ nhưng thấp hơn cao chiết rau má (CA). Bên cạnh đó, giá trị IC ở mức ức chế 25% và 75% cũng được tính toán để xác định chỉ số kết hợp của các cao chiết phối hợp trong tác dụng này (Bảng 4).

Bảng 5. Chỉ số kết hợp của các công thức phối hợp ở các nồng độ ức chế α-glucosidase khác nhau

Mẫu	Giá trị CI		
	25%	50%	75%
CT5	2.25 ± 0.14	2.13 ± 0.01	1.14 ± 0.01
CT6	1.03 ± 0.10	0.98 ± 0.02	0.51 ± 0.01
CT7	2.30 ± 0.15	1.58 ± 0.02	0.77 ± 0.01
CT8	1.99 ± 0.21	1.84 ± 0.01	1.00 ± 0.02

Kết quả phân tích cho thấy ở mức ức chế 25% hầu hết các công thức đều cho tương tác đối kháng (CI > 1), trong đó mức độ đối kháng của CT6 là thấp nhất (CI = 1.03 ± 0.10). Ở mức ức chế 50%, chỉ có CT6 có chỉ số CI < 1, tuy nhiên giá trị trung bình này rất gần 1 (CI = 0.98 ± 0.02). Điều này cho thấy CT6 thể hiện tương tác cộng gộp hơn là hiệp đồng ở mức ức chế 50%. Ở mức ức chế 75%, CT6 và CT7 thể hiện rõ tương tác hiệp đồng, trong đó CT6 có mức độ hiệp đồng cao hơn với CI = 0.51 ± 0.01. Trong khi đó, CT8 thể hiện tương tác cộng gộp và CT5 vẫn thể hiện tương tác đối kháng (Bảng 5). Nhìn chung, trong số các công thức khảo sát thì công thức phối hợp cao chiết đơn lẻ ở tỷ lệ 1MO: 1VA: 3CA (CT6) là công thức tốt nhất theo hướng ức chế *α*-glucosidase.

3.3. Tác dụng kháng oxy hóa

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol 45% đơn lẻ từ lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng

và rau má đều có tác dụng bắt gốc tự do DPPH, trong đó cao lá cây chùm ngây có tác dụng cao hơn đáng kể hai cao chiết đơn lẻ còn lại. Đối với các cao chiết phối hợp, khả năng bắt gốc tự do DPPH ở mức ức chế 50% của công thức phối hợp CT8 cao hơn các công thức khác và không có sự khác biệt ở tác dụng này giữa các công thức CT5, CT6 và CT7 (Bảng 6).

Bảng 6. Các giá trị IC của các mẫu nghiên cứu đối với tác dụng bắt gốc tự do DPPH

Mẫu	Giá trị IC (µg/mL)		
	25%	50%	75%
MO	32.22 ± 0.18	70.11 ± 0.56[a]	153.76 ± 4.15
VA	62.22 ±8.93	140.25 ± 6.12	218.28 ± 12.89
CA	63.90 ± 6.41	158.18 ± 5.87	252.47 ± 15.25
CT5	35.90 ± 3.05	101.74 ± 1.38	167.57 ± 5.81
CT6	28.58 ± 8.60	110.69 ± 3.38	192.80 ± 6.31
CT7	24.38 ± 0.66	106.37 ± 1.13	188.36 ± 2.84
CT8	19.79 ± 1.79	98.17 ± 1.15[b]	176.55 ± 3.40
Vitamin C	-	4.62 ± 0.04	-
Quercetin	-	8.32 ± 0.05	-

(-) Không xác định. [a]p < 0.0001: Ở mức 50%, khác biệt đáng kể so với các cao chiết còn lại.
[b]p < 0.05: Ở mức 50%, khác biệt đáng kể so với CT6, CT7.

Bảng 7. Chỉ số kết hợp của các công thức phối hợp ở các nồng độ ức chế DPPH khác nhau

Mẫu	Giá trị CI		
	25%	50%	75%
CT5	0.74 ± 0.06	0.92 ± 0.01	0.82 ± 0.03
CT6	0.54 ± 0.16	0.89 ± 0.03	0.89 ± 0.03
CT7	0.48 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.89 ± 0.01
CT8	0.43 ± 0.04	0.95 ± 0.01	0.90 ± 0.02

Kết quả phân tích cho thấy các công thức phối hợp đều thể hiện tương tác hiệp đồng (CI < 1) bắt gốc tự do DPPH ở cả 3 mức ức chế (Bảng 7).

Như vậy, từ các kết quả về khả năng ức chế α-glucosidase, bắt gốc tự do DPPH và phân tích chỉ số kết hợp cho thấy công thức phối hợp CT6 (1MO: 1VA: 3CA) là công thức tiềm năng nhất cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tăng đường huyết sau ăn là tình trạng cần được kiểm soát đối với người mắc bệnh đái tháo đường; trong đó, ức chế α-glucosidase là một trong những đích điều trị [1]. Mặt khác, các chất kháng oxy hóa được cho là có vai trò trong bảo vệ tế bào beta tiểu đảo tụy trước tình trạng stress oxy hóa do tăng glucose huyết [17]. Từ kết quả nghiên cứu sơ bộ ban đầu cho thấy các cao chiết từ lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng, rau má đơn lẻ và các công thức phối trộn đều có tiềm năng ức chế α-glucosidase. Trong đó, phương pháp chiết với ethanol 45% cho các cao chiết có tác dụng ức chế α-glucosidase cao hơn chiết nước. Kết quả công bố trước đây cũng cho thấy hỗn hợp ethanol: nước là dung môi tốt để chiết xuất hợp chất có tác dụng kháng oxy hóa và ức chế α-glucosidase; đây là

dung môi tốt để chiết xuất các hợp chất flavonoid từ lá chùm ngây [18]. Đối với 3 cao chiết ethanol 45% đơn lẻ, kết quả khảo sát tác dụng kháng oxy hóa *in vitro* bằng thử nghiệm DPPH cho thấy cao chiết lá chùm ngây có tác dụng cao nhất nhưng tác dụng ức chế *α*-glucosidase của cao chiết này thấp nhất. Ngược lại, cao chiết rau má có khả năng ức chế *α*-glucosidase cao nhất và tác dụng kháng oxy hóa thấp nhất. Cao chiết lá cây lá đắng đều thể hiện tác dụng ức chế *α*-glucosidase và kháng oxy hóa *in vitro*. Tác dụng sinh học khác nhau của 3 loại dược liệu có thể do sự đa dạng về thành phần hóa học trong mỗi loại.

Các nghiên cứu về lá chùm ngây cho thấy khả năng kháng oxy hóa mạnh chủ yếu do hàm lượng cao các hợp chất flavonoid như rutin, quercetin, isoquercetin, kaempferol, apigenin, myricetin, quercetin glycosid (quercetin-3-O-glucosid, quercetin-3-O-galactosid và quercetin 3-O-(6''-malonyl) glucosid) [5]. Dịch chiết nước, methanol, ethyl acetat và hexan từ lá chùm ngây được báo cáo có tác dụng ức chế *α*-glucosidase với IC_{50} lần lượt là 16.29, 8.22, 12.41, 9.4 mg/mL [2]. Tiềm năng của lá chùm ngây trong cải thiện bệnh đái tháo đường cũng được thử nghiệm *in vivo* [10] và trên lâm sàng. Lá chùm ngây có khả năng kháng oxy hóa nhưng không làm giảm đường huyết sau ăn trên người khỏe mạnh và đái tháo đường loại 2 [19]. Lá chùm ngây có tác dụng làm tăng tiết insulin 74% sau khi dùng liều duy nhất 4 g ở người khỏe mạnh [20].

Dịch chiết ethyl acetat giàu flavonoid từ cao chiết ethanol 70% rau má có tác dụng kháng oxy hóa thông qua thử nghiệm DPPH và ức chế *α*-glucosidase với IC_{50} tương ứng là 45.42 và 73.17 µg/mL. Kaempferol và quercetin là những flavonoid được phân lập từ rau má có tác dụng ức chế *α*-glucosidase tốt với giá trị IC_{50} tương ứng là 16.50 và 21.61 µg/mL. Ngoài ra, các hợp chất này cũng có khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} là 9.64 và 11.97 µg/mL [21]. Dịch chiết ethanol 70% rau má có tác dụng ức chế lipase tụy, *α*-amylase, *α*-glucosidase với IC_{50} tương ứng là 759.14, 536.51, 42.27 µg/mL [22]. Các hợp chất triterpen (acid asiatic, asiaticosid, acid madecassic, madecassosid) trong rau má có nhiều tác dụng như bảo vệ thần kinh, cải thiện chức năng nhận thức, hạ huyết áp, giảm xơ vữa động mạch, cải thiện tình trạng da... Acid asiatic có tiềm năng trong hạ lipid, tăng nhạy cảm insullin và leptin, kháng oxy hóa trong mô hình chuột béo phì [23].

Nghiên cứu trước đây cho thấy cao chiết nước và cao chiết ethanol 45% từ lá cây lá đắng có tác dụng giảm nồng độ glucose máu, bảo vệ gan thận chống stress oxy hóa gây ra bởi streptozotocin [11]. Dịch chiết ethanol 76% từ lá cây lá đắng có tác dụng ức chế *α*-amylase và *α*-glucosidase với IC_{50} tương ứng là 0.51 mg/mL và 0.49 mg/mL [24]. Dịch chiết phenolic có tác dụng ức chế *α*-amylase và *α*-glucosidase phụ thuộc nồng độ (4 - 16 µg/mL) [25]. Vernoamyosid E (một saponin steroid) từ lá cây lá đắng có tác dụng ức chế *α*-amylase và *α*-glucosidase với IC_{50} tương ứng là 50.17 ± 1.03 µg/mL và 60.03 ± 3.85 µg/mL [3].

Trong nghiên cứu này, cao chiết của 3 loại dược liệu được phối hợp theo các tỷ lệ khác nhau để khảo sát có hay không khả năng hiệp đồng ức chế *α*-glucosidase và kháng oxy hóa, góp phần trong cải thiện tình trạng bệnh lý đái tháo đường. Theo lý luận y học cổ truyền, sự tương tác phức tạp của các thành phần thảo dược được cho là có thể tăng cường sinh khả dụng của các thành phần tác dụng mang lại những tác động tích cực về mặt dược lực học và dược động học. Tương tác giữa cao chiết lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má được đánh giá dựa trên chỉ số kết hợp (CI) của Chou và Talalay. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các công thức đều có thể hiện tương tác hiệp đồng bắt gốc tự do DPPH, khả năng hiệp đồng được thể hiện mạnh nhất ở mức thấp. Tuy nhiên, chỉ số CI của các công

thức tăng dần khi tăng liều cho thấy khả năng hiệp đồng giảm dần khi tăng liều. Ngược lại, đối với tác dụng ức chế α-glucosidase, hầu hết các cao chiết thể hiện hoạt động đối kháng ở mức ức chế 25%, chỉ số kết hợp của các công thức giảm dần khi tăng liều. Như vậy có thể thấy, việc giảm liều làm tăng khả năng hiệp đồng kháng oxy hóa và tăng khả năng đối kháng trên tác dụng ức chế α-glucosidase. Sự khác biệt về chỉ số kết hợp của các công thức cho thấy hàm lượng và thành phần các chất trong công thức có ảnh hưởng đến tác dụng sinh học chung.

Saponin, tannin, phenolic, flavonoid là những hợp chất có thể có lợi để hỗ trợ điều trị đái tháo đường được tìm thấy nhiều trong lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má. Sự hiệp đồng mạnh của tổng saponin và flavonoid giúp tăng cường khả năng chống stress oxy hóa và điều chỉnh trao đổi chất [26]. Phenolic và flavonoid có thể là hợp chất chính liên quan đến sự hiệp đồng kháng oxy hóa của các loại thảo dược, khả năng hiệp đồng ức chế α-glucosidase liên quan đến hàm lượng hợp chất phenolic trong các chiết xuất khác nhau cũng đã được báo cáo [27]. Trong nghiên cứu này, công thức phối hợp từ cao chiết đơn lẻ ở tỷ lệ 1MO: 1VA: 3CA có hoạt động hiệp đồng tốt hơn các công thức còn lại và cũng thể hiện sự hiệp đồng trong khả năng kháng oxy hóa tốt. Công thức này là sự phối hợp của cao chiết từ lá cây chùm ngây, lá cây lá đắng và rau má với hy vọng tổng hợp được những tác dụng có lợi của cả ba dược liệu này trong điều trị hay hỗ trợ điều trị các bệnh lý khác nhau.

Nghiên cứu này được thực hiện ở mức *in vitro* chỉ ra rằng có sự tương tác hiệp đồng tác dụng theo hướng ức chế α-glucosidase và kháng oxy hóa bởi khả năng bắt gốc tự do DPPH, kết quả chủ yếu mang tính chất sàng lọc làm tiền đề cho các nghiên cứu sau này. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo trên *in vivo* là rất cần thiết để đánh giá tác dụng của công thức phối hợp một cách rõ ràng hơn, cung cấp các bằng chứng khoa học cho tiềm năng tác dụng của công thức này và việc sử dụng công thức này để phát triển các sản phẩm điều trị hay hỗ trợ điều trị các bệnh lý như đái tháo đường.

4. KẾT LUẬN

Cao chiết ethanol 45% được phối hợp ở tỷ lệ 1 cao chùm ngây: 1 cao lá đắng: 3 cao rau má có tác dụng ức chế α-glucosidase và kháng oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH. Công thức này thể hiện tương tác hiệp đồng ở cả hai tác dụng khảo sát. Các thử nghiệm *in vivo* cần được thực hiện để đánh giá tiềm năng của công thức này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Viện Dược liệu đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này thuộc đề tài mã số 05/2021/HĐ-ĐTCS-TTS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R. Goyal and I. Jialal, "Diabetes mellitus type 2", In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020, Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/.

[2] U. F. Magaji, O. Sacan and R. Yanardag, "Alpha amylase, alpha glucosidase and glycation inhibitory activity of *Moringa oleifera* extracts," South African Journal of Botany, Vol. 128, pp. 225-230, 2020. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.11.024.

[3] H. L. T. Anh, L. B. Vinh, L. T. Lien, … Y. H. Kim, "*In vitro* study on α-amylase inhibitory and α-glucosidase of a new stigmastane-type steroid

saponin from the leaves of *Vernonia amygdalina*," *Natural Product Research,* Vol. 35, No. 5, pp. 873-879, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1607853.

[4] V. Mehta, A. Sharma, S. Tanwar and U. Malairaman, "*In vitro* and *in silico* evaluation of the antidiabetic effect of hydroalcoholic leaf extract of *Centella asiatica*," *International Jounal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 8, No. 8, pp. 357-362, 2016.

[5] A. Bhattacharya, P. Tiwari, P. K. Sahu and S. Kumar, "A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*," *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, Vol. 10, No. 4, pp. 181-191, 2018. DOI: 10.4103%2FJPBS.JPBS_126_18.

[6] K. Y. Swee, Y. H. Wan, K. B. Boon, … B. A. Noorjahan, "Vernonia amygdalina, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bio-activities," Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 4, No. 25, pp. 2787-2812, 2010.

[7] D. C. Roy, S. K. Barman and M. M. Shaik, "Current updates on *Centella asiatica*: Phytochemistry, pharmacology and traditional uses," *Medicinal Plant Research*, Vol. 3, No. 4, pp. 20-36, 2013.

[8] E. E. A. Hisam, M. S. Rofiee, A. M. Khalid, … M. Z. Salleh, "Combined extract of *Moringa oleifera* and *Centella asiatica* modulates oxidative stress and senescence in hydrogen peroxide-induced human dermal fibroblasts," *Turkish journal of biology*, Vol. 42, No. 1, pp. 33-44, 2018. DOI: 10.3906/biy-1708-23.

[9] E. E. Efiong, G. O. Igile, B. I. A. Mgbeje, E. A. Out and P. E. Ebong, "Hepatoprotective and anti-diabetic effect of combined extracts of *Moringa oleifera* and *Vernonia amygdalina* in streptozotocin-induced diabetic albino *Wistar* rats," *Journal of Diabetes and Endocrinology*, Vol. 4, No. 4, pp. 45-50, 2013. DOI: 10.5897/JDE2013.0069.

[10] N. T. T. Huong, N. H. Minh and N. T. M. Anh, "Effects of a preparation from *Moringa oleifera* leaves (Moringa capsules) in diabetic mice," *Journal of Medicinal Materials*, Vol. 23, No. 3, pp. 171-179, 2018.

[11] D. T. Mong and N. T. T. Huong, "Effects of aqueous and ethanol extracts from Vernonia amygdalina leaves on blood glucose level and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice," Journal of Medicinal Materials, Vol. 24, No. 3, pp. 168-174, 2019.

[12] M. T. Chung và N. T. T. Hương, "Khảo sát tác dụng của cao chiết cồn từ Rau má (*Centella asiatica*) trên mô hình gây suy giảm trí nhớ bằng D-galactose," *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh,* Vol. 21, No. 6, pp. 169-174, 2017.

[13] L. H. Trieu, L. V. Minh and N. T. T. Huong, "*In vitro* α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities of crude and fractionated extracts of *Clerodendrum inerme* leaves collected from Phu Quoc Island," *Journal of Medicinal Materials*, Vol. 23, No. 5, pp. 283-289, 2018.

[14] H. T. Ly, T. T. H. Nguyen, T. T. L. Tran, … V. M. Le, "Hypoglycemic and antioxidant activities of *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. leaf extract on streptozotocin-induced diabetic models in mice," *Chinese herbal medicines*, Vol. 11, No. 4, pp. 387-393, 2019. DOI: 10.1016/j.chmed.2019.08.001.

[15] J. Gao, P. Xu, Y. Wang, Y. Wang and D. Hochstetter, "Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against *α*-amylase and *α*-glucosidase *in vitro*," *Molecules*, Vol. 18, No. 9, pp. 11614-11623, 2013. DOI: 10.3390/molecules 180911614.

[16] T. C. Chou and P. Talalay P, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors," *Advances in Enzyme Regulation*, Vol. 22, pp. 27-55, 1984. DOI: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.

[17] F. Giacco and M. Brownlee, "Oxidative stress and diabetic complications," *Circulation research*, Vol. 107, No. 9, pp. 1058-1070, 2010.

[18] G. Karthivashan, M. T. Fard, P. Arulselvan, F. Abas and S. Fakurazi, "Identification of bioactive candidate compounds responsible for oxidative challenge from hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves," *Jouranl of Food Science*, Vol. 78, No. 9, pp. 1368-1375, 2013. DOI: 10.1111/1750-3841.12233.

[19] R. Taweerutchana, N. LumLerdkij, S. Vannasaeng, P. Akarasereenont and A. Sriwijitkamol, "Effect of *Moringa oleifera* leaf capsules on glycemic control in therapy-naïve type 2 diabetes patients: A randomized placebo controlled study," *Evidnece-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2017, ID Article 6581390, 2017. DOI: 10.1155/2017/6581390.

[20] P. Anthanont, N. LumLerdkij, P. Akarasereenont, S. Vannasaeng and A. Sriwijitkamol, "*Moringa oleifera* leaf increases insulin secretion after single dose administration: A preliminary study in healthy subjects," *Journal of The Medical Association of Thailand*, Vol. 99, No. 3, pp. 308-313, 2016.

[21] R. T. Dewi and F. Maryani, "Antioxidant and α-glucosidase inhibitory compounds of *Centella asiatica*," *Procedia Chemistry*, Vol. 17, No. 2015, pp. 147-152, 2015. DOI: 10.1016/j.proche.2015.12.130.

[22] N. Supkamonseni, A. Thinkratok, D. Meksuriyen and R. Srisawat, "Hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Centella asiatica* (L.) extract *in vitro* and *in vivo*," *Indian Journal of Experimental Biology,* Vol. 52, No. 10, pp. 965-971, 2014.

[23] P. Rameshreddy, V. V. S. Uddandrao, P. Brahmanaidu, … G. Saravanan, "Obesity-alleviating potential of asiatic acid and its effects on ACC1, UCP2, and CPT1 mRNA expression in high fat diet-induced obese *Sprague-Dawley* rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 442, No. (1-2), pp. 143-154, 2018. DOI: 10.1007/s11010-017-3199-2.

[24] O. R. Alara and N. H. Abdurahman, Anti-diabetic activity and mineral elements evaluation of *Vernonia amygdalina* leaves obtained from Malaysia," *Journal of Research in Pharmacy*, Vol. 23, No. 3, pp. 514-521, 2019. DOI: 10.12991/jrp.2019.158.

[25] J. A. Saliu, A. O. Ademiluyi, A. J. Akinyemi and G. Oboh, "*In vitro* antidiabetes and antihypertension properties of phenolic extracts from bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.)," *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 36, No. 5, pp. 569-576, 2011. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00576.x.

[26] Y. Meng, Z. Du, Y. Li, … X. Guo , "The synergistic mechanism of total saponins and flavonoids in Notoginseng-Safflower pair against myocardial ischemia uncovered by an integrated metabolomics strategy," *Biomedecine Pharmacother*, Vol. 130, 110574, 2020. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110574.

[27] M. Li, Y. Xu, W. Yang, … D. Li, "*In vitro* synergistic anti-oxidant activities of solvent-extracted fractions from *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis*," *Food Science and Technology*, Vol. 44, No. 8, pp. 1745-1751, 2011. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.02.017.

In vitro α-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of combined extracts of *Moringa oleifera, Vernonia amygdalina*, and *Centella asiatica*

Le Thi Kim Oanh, Nguyen Lan Chi, Ly Hai Trieu and Le Van Minh*

ABSTRACT

This study investigated the in vitro α-glucosidase inhibitory and antioxidant properties of combined formulas of Moringa oleifera (MO), Vernonia amygdalina (VA), and Centella asiatica (CA) leaves. The results showed that the formula mixed from the single 45% ethanol extracts at the ratio of 1MO: 1VA: 3CA had better α-glucosidase inhibitory activity than other formulations and also had antioxidant capacity by DPPH free radical scavenging mechanism with an IC_{50} *value of 275.12 µg/mL and 110.69 µg/mL, respectively. This combined formula exhibited synergistic interactions in both α-glucosidase inhibition and DPPH free radical scavenging. Therefore, the optimal combination formula should be further studied on in vivo pharmacological activities to promote the good pharmacological properties of three medicinal herbs.*

Keywords: *Moringa oleifera, Vernonia amygdalina, Centella asiatica, α-glucosidase inhibition, antioxidant*

Received: 31/12/2021
Revised: 27/01/2022
Accepted for publication: 28/01/2022