

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ MEN α -GLUCOSIDASE CỦA CÁC CAO CHIẾT HẠT MƯỚP ĐẮNG

Phạm Thị Diệu Hạnh¹, Phùng Văn Trung²,
Nguyễn Ngọc Hạnh² và Nguyễn Đông Trúc²

ABSTRACT

Agents with α -glucosidase inhibitory activity have been useful as oral hypoglycemia in patients with type 2, non-insulin dependent, diabetes melitus.

Some extracts of different solvents from the seed of *Momordica charantia* L. were investigated. Preliminary results showed that the alcohol extract gives the greatest α -glucosidase inhibitory activity ($IC_{50}=31,25 \mu\text{g/ml}$); chloroform extract is weakly and the etherpetroleum extract is inactivity.

Keywords: *Momordica charantia* L., α -glucosidase, diabetes melitus

Title: Investigation on α -glucosidase inhibitory activity of some extracts from the seeds of *Momordica charantia* L.

TÓM TẮT

Các chất có tác dụng ức chế men α -glucosidase đã được dùng làm thuốc hạ đường huyết bằng đường uống nhằm kiểm soát sự tăng đường huyết ở các bệnh nhân tiểu đường type 2 – không phụ thuộc vào insulin. Cao chiết bởi các dung môi khác nhau từ hạt mướp đắng đã được khảo sát tác dụng ức chế theo cơ chế này. Kết quả khảo sát bước đầu cho thấy, cao cồn có tác dụng ức chế mạnh nhất ($IC_{50} = 31,25 \mu\text{g/ml}$), cao clorofom có tác dụng yếu hơn, trong khi cao ete petrol không thể hiện hoạt tính.

Từ khoá: Mướp đắng, *Momordica charantia* L., α -glucosidase, tiểu đường

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Chứng tăng đường huyết cao sau khi ăn đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của bệnh tiểu đường type 2, do đó phương pháp ức chế men α -glucosidase trong điều trị tiểu đường type 2 là phương pháp được sử dụng phổ biến hiện nay. Cơ chế này trong bộ phận tiêu hóa chứ không tham gia tụy tạng.

Các thuốc ức chế men α -glucosidase hiện nay đã có mặt trên thị trường dưới 2 nhóm thuốc là Arcabose và Voglibose.

Phương pháp *in vitro* để khảo sát hoạt tính ức chế men α -glucosidase dựa trên nguyên tắc: men α -glucosidase khi gặp nối α -D-glucose sẽ cắt đứt nối này để giải phóng đường D-glucose. Hoạt động này sản sinh ra nhiều glucose sau khi ăn và làm gia tăng hàm lượng glucose trong máu, do đó cần ức chế hoạt động của men α -glucosidase để làm chậm sự chuyển hoá một số loại thức ăn thành glucose. Vì vậy, người ta sử dụng các chất nền có liên kết α với đường D-glucose như: p-

¹ Đại học Cần Thơ

² Viện Công nghệ Hóa học

Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, maltose... để xây dựng phương pháp thử hoạt tính ức chế men α -glucosidase trong phòng thí nghiệm.

Trong báo cáo này, chúng tôi xây dựng phương pháp thử hoạt tính ức chế men α -glucosidase trên chất nền *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng để tìm điều kiện tối ưu. Trên cơ sở đó, khảo sát hoạt tính ức chế của một số cao chiết từ hạt Mướp Đắng (*Momordica charantia* L.) trồng tại Việt Nam.

2 ĐỐI TƯỢNG VÀ MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Trái mướp đắng thu mua tại khu vực Thành phố Hồ Chí Minh là những trái già, gần chín được tách lấy hạt. Chọn lấy những hạt già, sấy đến trọng lượng không đổi ở 60°C.

2.2 Mục tiêu nghiên cứu

Xây dựng quy trình thử hoạt tính ức chế men α -glucosidase trong phòng thí nghiệm.

Khảo sát hoạt tính ức chế men α -glucosidase đối với các cao chiết từ hạt mướp đắng.

3 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1 Hoá chất

- A. Dung dịch *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNP-Glc) 1mM (pha trong nước khử ion) (Merck).
- Dung dịch *p*-Nitrophenol (PNP) chuẩn 0,1mM (Merck).
- α - glucosidase (α -glc) 0,9 U/ml (pha trong nước khử ion lạnh) (Sigma).
- Đệm phosphat pH 6,8 (Prolabo)
- Đệm natricacbonat pH 9,6 (Prolabo)
- Cao chiết.
- Nước khử ion

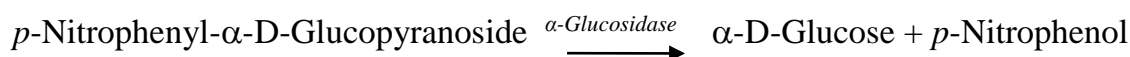
3.2 Thiết bị

- Spectrophotometer DR 2000
- Incubator

4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Xây dựng quy trình thử nghiệm

4.1.1 Nguyên tắc



Theo phản ứng, lượng glucose sinh ra tỉ lệ với PNP. Vì vậy có thể đo độ hấp thụ của PNP ở 400nm để xác định lượng glucose sinh ra. So sánh hàm lượng glucose

sinh ra giữa mẫu có chất ức chế và mẫu không có chất ức chế để xác định % ức chế. Dạng đường biểu diễn giữa % ức chế và nồng độ chất ức chế để xác định chỉ số IC₅₀.

Điều kiện phản ứng: T=37°C, pH = 6,8.

Các bước tiến hành:

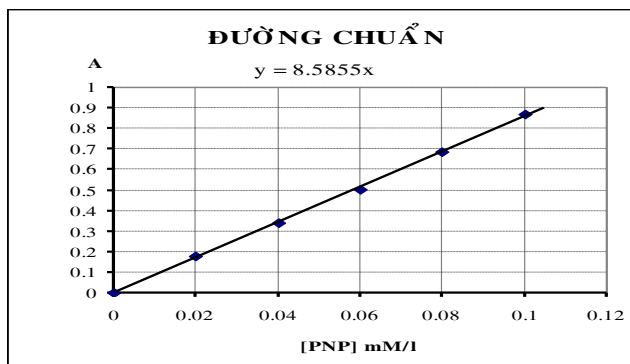
- Chuẩn bị các dung dịch thử chuẩn (enzym, chất nền, các dung dịch đệm, chất ức chế...)
- Trộn lẫn các dung dịch gồm: đệm pH 6,8; enzym; chất ức chế với thể tích đã định trước.
- Hoạt hoá hỗn hợp ở 37°C trong thời gian T_a.
- Thêm chất nền, duy trì phản ứng ở 37°C, trong thời gian T_r.
- Kết thúc phản ứng bằng đệm pH 9,6.
- Đo độ hấp thu A ở 400nm, dựa vào đường chuẩn để xác định lượng glucose sinh ra, từ đó xác định % ức chế và suy ra chỉ số IC₅₀.

4.1.2 Xây dựng đường chuẩn

Pha các dung dịch PNP có nồng độ như bảng dưới đây và đo độ hấp thu A ở bước sóng 400nm.

Bảng 1: Kết quả đo độ hấp thu A theo nồng độ PNP

[PNP] (mM)	Độ hấp thu A
0	0
0,02	0,177±0,011
0,04	0,340±0,007
0,06	0,502±0,009
0,08	0,684±0,013
0,10	0,869±0,010



Hình 1: Tương quan giữa độ hấp thu A và nồng độ PNP

4.1.3 Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng

(a) Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất nền

- Thực nghiệm: pha các dung dịch theo bảng sau

Bảng 2: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất nền

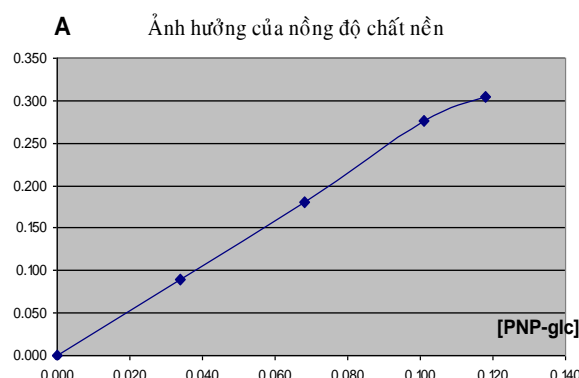
Tác chất	Mẫu 0	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4
Nước khử ion (G)	0,7ml	0,5ml	0,3ml	0,1ml	0 ml
Đệm phosphat (D)	5,0ml	5,0ml	5,0ml	5,0ml	5,0ml
Enzym (C)	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml
Ủ ở 37°C trong 30 phút sau đó thêm:					
PNP – Glc (B)	0ml	0,2ml	0,4ml	0,6ml	0,7ml

Các mẫu trên được lắc thật đều rồi ủ tiếp ở 37°C trong đúng 20 phút. Từ mỗi mẫu, lấy 2ml dung dịch cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 8ml đệm carbonat pH 9,6 (E), lắc đều rồi đem đo độ hấp thu A ở 400nm.

- Kết quả

Bảng 3: Kết quả đo độ hấp thu A theo nồng độ chất nền

PNP-Glc		Độ hấp thu A
(ml)	(mM)	
0,0	0	0
0,2	0,34	0,089±0,003
0,4	0,068	0,181±0,011
0,6	0,101	0,276±0,005
0,7	0,118	0,305±0,007



Hình 2: Tương quan giữa độ hấp thu A và nồng độ chất nền

- Nhận xét: độ hấp thu A thay đổi tuyến tính bậc 1 với nồng độ chất nền. Tuy nhiên, nếu sử dụng ở nồng độ cao hơn 0.1mM thì tỉ lệ không còn là tuyến tính bậc 1. Vì vậy chọn nồng độ chất nền là 0,085mM là thích hợp cho qui trình.

(b) Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzym

- Thực nghiệm: pha các dung dịch theo bảng sau

Bảng 4: Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzym

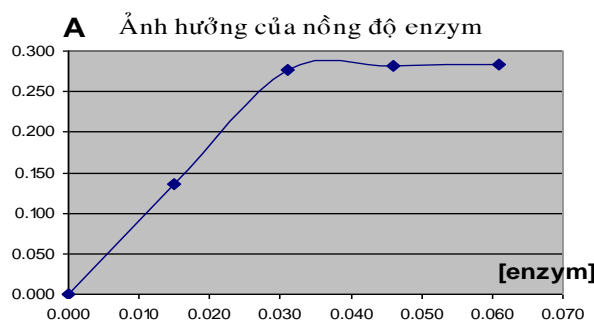
Tác chất	Mẫu 0	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4
Nước khử ion (G)	0,4ml	0,3ml	0,2ml	0,1ml	0ml
Đệm phosphat (D)	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Enzym (C)	0ml	0,1ml	0,2ml	0,3ml	0,4ml
Ủ ở 37°C trong 30 phút sau đó thêm:					
PNP – Glc (B)	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml

Các mẫu trên được lắc thật đều rồi ủ tiếp ở 37°C trong đúng 20 phút. Từ mỗi mẫu, lấy 2ml dung dịch cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 8ml đệm carbonat pH 9,6 (E), lắc đều rồi đem đo độ hấp thu A ở 400nm.

- Kết quả

Bảng 5: Kết quả đo độ hấp thu A theo nồng độ enzym

Enzym		Độ hấp thu A
(ml)	(U/ml)	
0	0	0
0,1	0,015	0,1366±0,008
0,2	0,031	0,277±0,005
0,3	0,046	0,282±0,012
0,4	0,061	0,284±0,003



Hình 3: Tương quan giữa độ hấp thu A và nồng độ enzym

- Nhận xét: Qui trình ổn định trong khoảng nồng độ enzym trên 0,031U/ml.

(c) Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng T_r

- Thực nghiệm: Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng như trong bảng dưới đây

Bảng 6: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng T_r

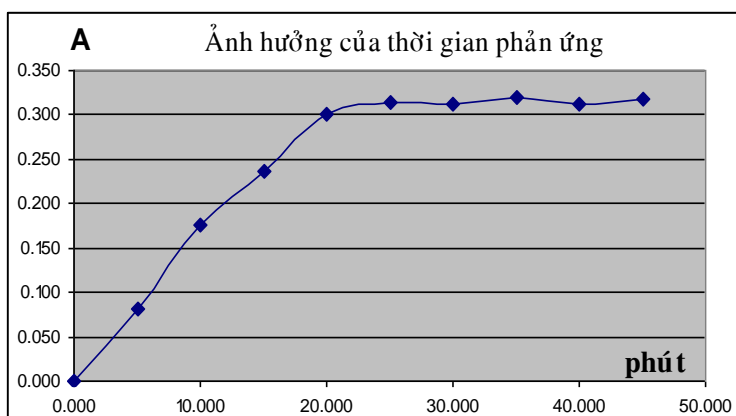
Tác chất	Mẫu trắng	Mẫu thử
Nước khử ion (G)	0,4ml	0,2ml
Đệm phosphat (D)	5,0ml	5,0ml
Enzym (C)	0 ml	0.2ml
Ủ ở 37°C trong 30 phút sau đó thêm:		
PNP – Glc (B)	0,5ml	0,5ml

Hỗn hợp trên được lắc thật đều rồi tiếp tục duy trì ở 37°C, sau mỗi 5 phút lấy ra đo độ hấp thu A ở 400nm đến khi A không đổi ở 3 lần đo kế tiếp nhau.

- Kết quả

Bảng 7: Kết quả đo độ hấp thu A theo thời gian phản ứng

T_r (phút)	A
0	0,000
5	0,081
10	0,176
15	0,236
20	0,300
25	0,314
30	0,312
35	0,320
40	0,312
45	0,318



Hình 4: Tương quan giữa độ hấp thu A và thời gian phản ứng

- Nhận xét: Độ hấp thu A tăng tuyến tính trong khoảng 23 phút đầu tiên của phản ứng, vì vậy chọn thời gian thích hợp cho phản ứng là 20 phút.

(d) Khảo sát ảnh hưởng của thời gian hoạt hóa enzym T_a

- Thực nghiệm: Chuẩn bị 7 mẫu tương tự nhau như trong bảng dưới đây

Bảng 8: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian hoạt hóa enzym

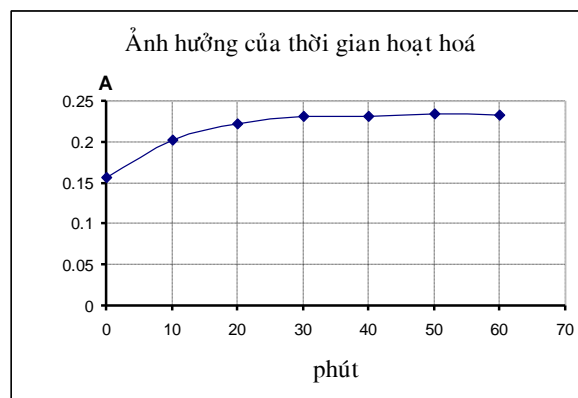
Tác chất	Mẫu trắng	Mẫu thử
Nước khử ion (G)	0,4ml	0,2ml
Đệm phosphat (D)	5,0ml	5,0ml
Enzym (C)	0 ml	0,2ml
Mỗi mẫu ủ ở 37°C trong 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 phút sau đó thêm:		
PNP – Glc (B)	0,5ml	0,5ml

Mỗi hỗn hợp trên được lắc thật đều rồi ủ tiếp ở 37°C trong đúng 20 phút. Lấy 2ml hỗn hợp, cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 8ml dung dịch đệm carbonat pH 9.6 (E), lắc đều rồi đem đo độ hấp thu A ở 400nm.

- Kết quả

Bảng 9: Kết quả đo độ hấp thu A theo thời gian hoạt hoá enzym

T _a (phút)	A
0	0,157±0,007
10	0,202±0,012
20	0,223±0,005
30	0,231±0,005
40	0,235±0,003
50	0,237±0,007
60	0,235±0,003



Hình 5: Tương quan giữa độ hấp thu A và thời gian hoạt hóa enzym

- Nhận xét: Qui trình ổn định sau 30 phút hoạt hóa mẫu.

4.2 Thử hoạt tính của các cao chiết

4.2.1 Điều chế các cao chiết

Hạt mướp đắng đã sấy khô ở trên (400g) được chiết bằng Soxhlet lần lượt với ete petrol, clorofom và cồn. Sau khi lọc và cô loại dung môi dưới áp suất kém, thu được cao tương ứng là H1 (42g), H2 (15g) và H3 (25g). Các cao chiết này dùng để thử hoạt tính.

4.2.2 Thử hoạt tính của các cao chiết

- Thực nghiệm

Chuẩn bị các dịch chiết H1, H2, H3 có nồng độ 2.95mg/ml tương ứng với nồng độ 100µg/ml trong hỗn hợp phản ứng. Pha loãng để có các nồng độ C_i: 100, 75, 50, 25 và 0 µg/ml. Thực hiện đối với mỗi nồng độ của từng loại cao chiết theo bảng sau

Bảng 10: Thử hoạt tính của các cao chiết

TÁC CHẤT	THẺ TÍCH (ml)	
	Mẫu trắng	Mẫu ức chế
Nước khử ion (G)	0,2	0
Đệm phosphat (D)	5,0	5,0
Enzym (C)	0	0,2
Chất ức chế (F) có nồng độ C _i	0,2	0,2
Ủ ở 37°C trong 30 phút sau đó thêm:		
PNP – Glc (B)	0,5ml	0,5ml

Hỗn hợp trên được lắc thật đều rồi ủ tiếp ở 37°C trong đúng 20 phút. Lấy 2ml hỗn hợp, cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 8ml dung dịch đệm carbonat pH 9,6 (E), lắc đều rồi đem đo độ hấp thu A ở 400nm.

- Kết quả

Hoạt tính ức chế của cao chiết được tính theo công thức

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{[\text{glc}]_0 - [\text{glc}]_i}{[\text{glc}]_0}$$

Do [glc] tỉ lệ với [PNP] nên

$$\% \text{ ức chế} = \frac{[\text{PNP}]_0 - [\text{PNP}]_i}{[\text{PNP}]_0}$$

Hay

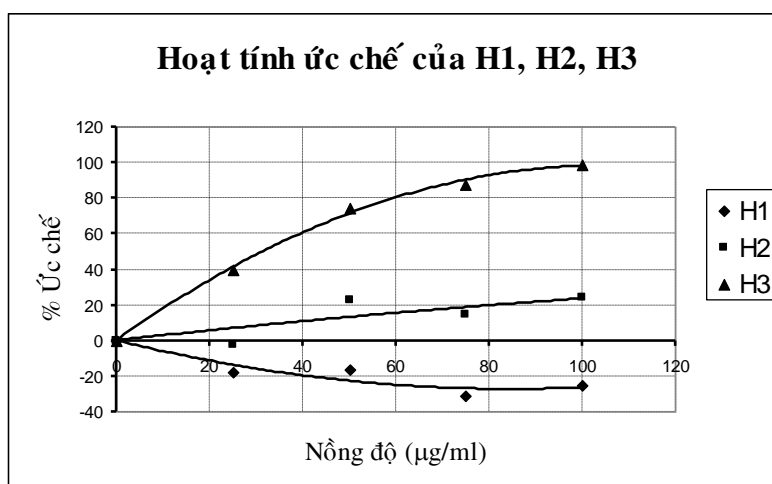
$$\% \text{ ức chế} = \frac{[\text{A}]_0 - [\text{A}]_i}{[\text{A}]_0}$$

Trong đó

- [glc]₀: Nồng độ glucose sinh ra khi không sử dụng chất ức chế (mM/l)
- [glc]_i: Nồng độ glucose sinh ra khi sử dụng chất ức chế ở nồng độ i (mM/l)
- [PNP]₀: Nồng độ PNP sinh ra khi không sử dụng chất ức chế (mM/l)
- [PNP]_i: Nồng độ PNP sinh ra khi sử dụng chất ức chế ở nồng độ i (mM/l)
- [A]₀: Độ hấp thu khi không sử dụng chất ức chế
- [A]_i: Độ hấp thu khi sử dụng chất ức chế ở nồng độ i

Bảng 11: Kết quả đo A và tính toán % ức chế

Nồng độ chất ức chế (µg/ml)	H1		H2		H3	
	A	% ỨC	A	% ỨC	A	% ỨC
0	0,055±0,005	0	0,096±0,003	0	0,280±0,002	0
25	0,065±0,010	-18,18	0,098±0,004	-2,08	0,168±0,003	40,00
50	0,064±0,007	-16,36	0,074±0,006	22,92	0,073±0,002	73,93
75	0,072±0,003	-30,91	0,082±0,002	14,58	0,034±0,004	87,86
100	0,069±0,011	-25,45	0,073±0,007	23,96	0,003±,001	98,93



Hình 6: Tương quan giữa % ức chế và nồng độ chất ức chế

- Nhận xét: Cao H1 không có hoạt tính ức chế men α-glucosidase, cao H2 có hoạt tính yếu, cao H3 có hoạt tính mạnh hơn (IC₅₀=31,25 µg/ml)

5 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

- Đã xây dựng được qui trình *in vitro* thử hoạt tính kháng tiêu đường theo cơ chế ức chế men α -glucosidase với các điều kiện như sau:
 - (i) Dùng chất nền là *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, nồng độ 0,085 μ M/ml.
 - (ii) Nồng độ enzym thích hợp là 0,031U/ml.
 - (iii) Thời gian hoạt hoá là 30 phút.
 - (iv) Thời gian phản ứng là 20 phút.
- Đã thử hoạt tính đối với các cao chiết từ hạt mướp đắng. Kết quả là cao H2 có hoạt tính yếu, cao H3 có hoạt tính mạnh hơn (IC₅₀=31,25 μ g/ml)
- Cần thực hiện phương pháp chiết tách và cô lập các hoạt chất từ cao H3 để tìm kiếm các hoạt chất có khả năng ức chế men α -glucosidase.
- Tiếp tục thử nghiệm hoạt tính ức chế men α -glucosidase của cao H3 và các chất cô lập từ cao H3 trên động vật sống (*in vivo*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- α -Glucosidase assay (Colorimetric for quantitative determination of α -glucosidase (maltase) in human semen research samples), Roche, 1/2005.
- Haimin Chen, Xiaojun Yan, Wei Lin, Li Zheng and Weiwei Zhang, A new method for screening α - glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms, *Pharmaceutical Biology*, Vol.42, No.6, pp. 416-421, 2004.
- Hideyuki Matsuura, Chikako Asakawa, Masanori Kurimoto, Junia Miyutani, α -glucosidase inhibitor from the seeds of Balsam pear (*Momordica charantia* L.) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, Vol.66, No.7, pp. 1576-1578, 2002
- Kyoshi Matsumoto, Kayoko Takemata et al. A novel method for the assay of α -glucosidase inhibitory activity using a multi-channel oxygen sensor, *Analytical Sciences*, Vol.18, 2002.
- Sigma, Enzymatic assay of α -glucosidase, 1994.