

Khảo sát tỉ lệ hỗn hợp cao chiết từ lá Sen, thân rễ Nghệ và thân rễ Hoàng liên nhằm nâng cao hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và lipase tuyến tụy

Lê Thị Thu Trang*, Võ Ngọc Tố Trinh, Nguyễn Đức Hoài Nam

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*ltttrang@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Các thuốc tổng hợp như orlistat và acarbose hỗ trợ giảm cân thông qua ức chế α -amylase và lipase nhưng gây tác dụng phụ. Khảo sát tỉ lệ hỗn hợp cao chiết từ lá Sen, thân rễ Nghệ và thân rễ Hoàng liên có hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy. Dùng phần mềm Design-Expert 13 và mô hình D-Optimal để thiết kế thí nghiệm với ba biến độc lập là tỉ lệ (%) các cao chiết: lá Sen (X_1), thân rễ Nghệ (X_2) và thân rễ Hoàng liên (X_3). Các giá trị X_1 , X_2 , X_3 biến thiên từ 0 % đến 100 % và $X_1 + X_2 + X_3 = 100$ %. Hàm mục tiêu Y_1 và Y_2 lần lượt là giá trị IC_{50} α -amylase và lipase tuyến tụy. Kết quả tỉ lệ hỗn hợp cao chiết tối ưu (X_1 : 58,2 %, X_2 : 36,6 % và X_3 : 5,2 %) và dự đoán $Y_1 = 3$ μ g/mL và $Y_2 = 8$ μ g/mL với $\alpha = 0,05$. Kết quả kiểm chứng bằng thực nghiệm không chênh lệch nhiều với giá trị dự đoán với IC_{50} của α -amylase và lipase của hỗn hợp là ($3,043 \pm 0,074$) μ g/mL và ($8,183 \pm 0,275$) μ g/mL, so với acarbose ($2,645 \pm 0,138$) μ g/mL và orlistat ($1,630 \pm 0,004$) μ g/mL. Hỗn hợp cao chiết được đề xuất có hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tốt nhất so với các nghiệm thức khảo sát.

Nhận 10/09/2024

Được duyệt 13/10/2024

Công bố 28/10/2024

Từ khóa

α -amylase, Béo phì, D-optimal, Design-Expert, Lipase

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), khoảng 16 % người trưởng thành trên thế giới bị béo phì vào năm 2022, tăng hơn gấp đôi so với năm 1990. Do đó, việc phòng ngừa béo phì là rất quan trọng để hạn chế tỉ lệ mắc bệnh và tử vong ngày càng tăng [1].

Ức chế hoạt động của các enzyme tiêu hóa để chậm quá trình hấp thu carbohydrat và giảm hấp thụ axit béo là một phương pháp an toàn để điều trị béo phì và tiểu đường tuýp 2. Các thuốc tổng hợp như orlistat và acarbose là chất ức chế α -amylase và lipase nhưng có nhiều tác dụng phụ gây đầy hơi và ảnh hưởng đến tiêu hóa, nghiêm trọng có thể gây đau tim, đột quỵ và tổn thương gan [2]. Những năm gần đây đã có một số nghiên cứu về việc phát triển các nguyên liệu từ tự nhiên, không gây tác dụng phụ để chống béo phì bằng cách giảm cảm giác thèm ăn và giảm cân [3].

Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) là một loài thực vật thủy sinh thuộc họ Nelumbonaceae. Y học Trung Quốc sử dụng lá Sen để điều trị tăng lipid máu, tăng đường huyết, chống béo phì và chống xơ vữa động mạch. Lá Sen chứa nhiều flavonoid và alkaloid, bao gồm isoquercetin, hyperin, kaempferol, astragalin và myricetin [4]. Lá Sen còn có tác dụng chống oxy hóa và giảm tổn thương gan do chế độ ăn nhiều chất béo và stress oxy hóa [5].

Nghệ (*Curcuma longa* L.) là cây thân thảo lâu năm thuộc họ Zingiberaceae thành phần chính gồm các chất curcuminoid như curcumin, demethoxycurcumin và bis-demethoxycurcumin. Các thành phần này có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống viêm, điều trị hội chứng chuyển hóa và chống ung thư. Dịch chiết nước thân rễ Nghệ làm giảm sự tích tụ lipid trong mô hình chuột béo phì [6].



Hoàng liên (*Coptis chinensis* Franch.) là loài cây thân thảo thuộc họ Ranunculaceae. Trong y học cổ truyền, thân rễ Hoàng liên trị bệnh mạch vành, ứ mật và viêm dạ dày. Thân rễ Hoàng liên chứa các alkaloid gồm berberin, coptisin, palmatin, epiberberin và jatrorrhizin có tác dụng ngăn ngừa tăng cân, giảm nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid và thúc đẩy bài tiết acid mật trong phân [7].

Nhận thấy tiềm năng về tác dụng giảm cân của các dược liệu trên, nghiên cứu này khảo sát khả năng ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy khi kết hợp các dược liệu trên theo tỉ lệ khác nhau và đề xuất một tỉ lệ tối ưu. Phần mềm Design-Expert 13 với mô hình D-Optimal được sử dụng để thiết kế thí nghiệm và phân tích thống kê để tối ưu hóa đạt kết quả chính xác trong thời gian và nguồn lực tối thiểu.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Lá Sen (LS) bánh tẻ, tươi, bỏ cuống thu hái ở huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp, rửa sạch, cắt nhỏ và phơi khô tự nhiên; thân rễ Nghệ (TRN), thân rễ Hoàng liên (TRH) khô mua tại Công ty TNHH Dược liệu Hồng Lan (quận Gò Vấp, TP. HCM).

Mẫu chuẩn: TRN (mã số 0324002), TRH (mã số 0124001) được cung cấp bởi Bệnh viện Y học Cổ truyền TP. HCM; LS (mã số 002665) được cung cấp bởi Viện Y dược học dân tộc.

Thiết bị nghiên cứu: tủ sấy (Binder, Germany), cân phân tích (Kern ALS 22-4N, Germany), máy ly tâm (Hermle, Germany), máy cô quay chân không (Hei-VAP, Germany), máy đọc đĩa ELISA (Biotek, USA).

Hóa chất nghiên cứu: ethanol (China), dimethyl sulfoxid DMSO (Fisher, USA), tinh bột (Fisher, USA), α -amylase tuyến tụy (Sigma Aldrich, USA), lipase tuyến tụy (Sigma Aldrich, USA), acarbose (Macklin, China), *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP, Macklin, China), Tris base (Himedia, India), orlistat (Macklin, China).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

Mẫu được kiểm nghiệm theo các chuyên luận trong Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V) bao gồm chuyên luận Sen (Lá), chuyên luận Nghệ (Thân rễ), chuyên luận Hoàng liên (Thân rễ) với các chỉ tiêu: cảm quan, soi bột và định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) so với dược liệu chuẩn [8].

2.2.2 Chiết xuất cao

Chiết riêng mỗi loại dược liệu (LS, TRN, TRH) từ

1 000 g bột khô, ngâm với 7 000 mL dung môi ethanol 50 % ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, tỉ lệ 1:7 (khối lượng / thể tích), lặp lại 3 lần. Dịch sau chiết được gộp lại cô quay chân không thu hồi dung môi và thu được cao tổng. Hiệu suất thu nhận cao tổng được tính bằng công thức:

$$Y (\%) = \frac{b(100 - h_b)}{a(100 - h_a)} \times 100$$

Với a, b lần lượt là khối lượng bột dược liệu và cao thu được (g); h_a , h_b lần lượt là độ ẩm của bột dược liệu và cao thu được (%).

2.2.3 Khảo sát tỉ lệ của hỗn hợp cao chiết từ LS, TRN, TRH có hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy tốt nhất

Hỗn hợp cao chiết gồm LS, TRN và TRH, được chọn làm biến độc lập để khảo sát và tối ưu hóa hoạt tính ức chế α -amylase (Y_1) và lipase (Y_2). Sử dụng mô hình D-optimal với ba biến độc lập là tỉ lệ (%) của LS (X_1), TRN (X_2), và TRH (X_3), trong khoảng từ 0 % đến 100 % và $X_1 + X_2 + X_3 = 100$ %, phần mềm Design-Expert 13 đề xuất ma trận thực nghiệm gồm 16 nghiệm thức (NT) với tỉ lệ khác nhau của các biến (Bảng 3). Tiến hành thực nghiệm khảo sát hoạt tính ức chế α -amylase và lipase của từng NT. Sau đó, kết quả thực nghiệm tiếp tục được phân tích hồi quy và tối ưu hóa bằng phần mềm Design-Expert 13 (Bảng 2). Kết quả hiển thị phân tích hồi quy ANOVA, đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện tỉ lệ tối ưu của hỗn hợp các cao chiết và giá trị dự đoán hoạt tính ức chế α -amylase và lipase (Y_1 , Y_2). Lưu ý, lựa chọn phương trình hồi quy có dạng hàm bậc 2 $Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + a_1X_1^2 + b_1X_2^2 + c_1X_3^2 + a_2X_1X_2 + b_2X_1X_3 + c_2X_2X_3$. Hàm bậc 2 thường được lựa chọn vì tính đơn giản nhưng vẫn mô phỏng tốt và thể hiện được sự tương tác giữa các biến.

2.2.4 Khảo sát hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy

Pha cao chiết trong DMSO 10 % và pha loãng thành dãy nồng độ (1 200; 600; 300; 150; 75; 37,5; 18,75 và 9,375) μ g/mL.

Hoạt tính ức chế enzym α – amylase

Dùng phương pháp (có điều chỉnh) hỗn hợp phản ứng gồm 50 μ L dịch cao chiết, 20 μ L enzym α -amylase (0,3 U/mL) và 20 μ L đệm phosphat pH = 6,5. Ủ hỗn hợp ở 37 °C trong 10 phút. Thêm 70 μ L tinh bột (1 mg/mL) và ủ tiếp ở 37 °C trong 10 phút [9]. Dùng phản ứng bằng 20 μ L HCl 1 M và thêm 70 μ L dung dịch Iod 0,1 N. Đo lượng tinh bột còn lại ở bước sóng 660 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng ELISA. Phần trăm α -amylase bị

ức chế (%) = $\{100 - [(A-B)/A]\} \times 100$. Với A là độ hấp thụ của dung dịch đối chứng, B là độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng. Acarbose được sử dụng làm đối chứng dương, thử nghiệm ở dãy nồng độ (600; 300; 150; 75; 37,5; 18,75 và 9,375) $\mu\text{g/mL}$.

Hoạt tính ức chế enzym lipase tuyến tụy

Dùng phương pháp (có điều chỉnh) hỗn hợp phản ứng gồm 16 μL dịch cao chiết, 162 μL đệm Tris-HCl pH = 8,5, 12 μL enzym lipase (150 U/mL), và 10 μL chất nền p-NPP (5,6 mg/1,6 mL acetonitril, pha loãng đến 5 mL bằng ethanol) [10]. Ủ ở 37 °C trong 10 phút, đo quang phổ ở bước sóng 405 nm bằng máy ELISA. Tỷ lệ α -amylase bị ức chế (%) = $\{[(A-B)-(C-D)]/(A-B)\} \times 100$. Với A là độ hấp thụ của mẫu chứng (đệm, enzym và chất nền), B là độ hấp thụ của mẫu chuẩn (đệm, chất nền), C là độ hấp thụ của mẫu thử (cao chiết, đệm, enzyme, chất nền), D là độ hấp thụ của mẫu trắng thử (cao chiết, đệm, chất nền). Orlistat được dùng làm đối chứng dương thử nghiệm ở dãy nồng độ (600; 300; 150; 75; 37,5; 18,75 và 9,375) $\mu\text{g/mL}$.

2.2.5 Kiểm chứng kết quả bằng thực nghiệm:

Phối trộn 3 lần hỗn hợp cao chiết được đề xuất bởi phần mềm, sau đó đánh giá hoạt tính ức chế α -amylase và

lipase của hỗn hợp. Tính giá trị trung bình và bias (độ lệch) để so sánh với giá trị dự đoán và thực nghiệm.

$$\text{Bias (\%)} = \frac{|\text{giá trị dự đoán} - \text{giá trị thực nghiệm}|}{\text{giá trị thực nghiệm}} \times 100$$

Giá trị bias thể hiện sự sai khác giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm của một mô hình, bias càng thấp thì mô hình càng đáng tin cậy [11].

3 Kết quả

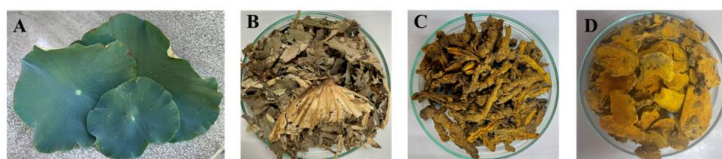
3.1 Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

3.1.1 Đặc điểm cảm quan

LS khô nhăn nheo, nhàu nát, mặt trên màu xám tro, mặt dưới màu nâu, mép nguyên, vài mảnh có vết tích của cuống lá lồi lên, màu nâu. Gân lá tỏa tròn, lồi ở mặt dưới lá. Lá khô, giòn, dễ vụn nát, có mùi thơm.

TRN lát cắt khô, cứng, chắc, màu vàng sậm. Mặt cắt ngang thấy rõ 2 vùng: vỏ và trung trụ. Vùng vỏ mỏng chiếm $\frac{1}{4}$ màu vàng nhạt, vùng trung trụ chiếm $\frac{3}{4}$ màu vàng sậm. Bên ngoài lớp vỏ sần sùi, nhiều sẹo.

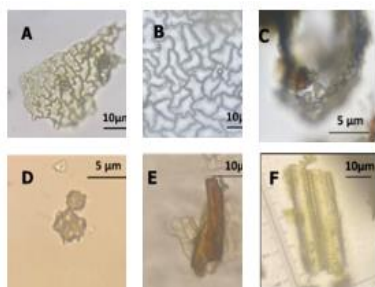
TRH có những mảnh cong queo, có phân nhánh. Bên ngoài lớp vỏ sần sùi, khúc khuỷu. Mặt ngoài màu vàng nâu, mang vết tích của rễ con; bên trong màu vàng tươi.



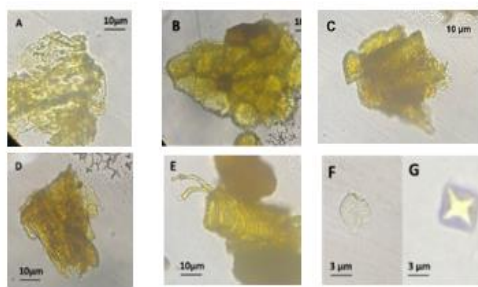
Hình 1 Đặc điểm cảm quan của dược liệu

A. LS tươi B. LS khô C. TRH khô D. TRN khô

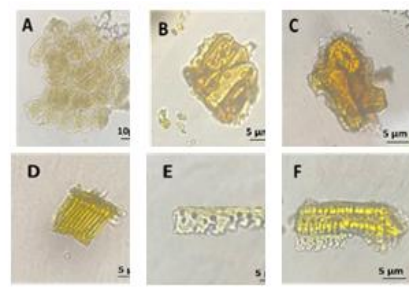
3.1.2 Đặc điểm bột dược liệu: bột LS (Hình 2) có mảnh tế bào biểu bì trên có lỗ khí (2A), mảnh biểu bì dưới không có lỗ khí (2B), vách ngoài của tế bào biểu bì có nhiều nướm lồi lên (2C), có tinh thể calci oxalat hình cầu gai (2D), mạch xoắn (2E) và mạch mạng (2F).



Hình 2 Các cấu trúc trong bột LS



Hình 3 Các cấu trúc trong bột TRN



Hình 4 Các cấu trúc trong bột TRH

Bột TRN (Hình 3) có mảnh mô mềm vách mỏng chứa nhiều hạt tinh bột (3A), tế bào chứa tinh dầu và nhựa tạo các mảng màu vàng (3B), hạt tinh bột (3F), tinh thể hình khối (3G), mạch vách (3C), mạch mạng (3D) và mạch xoắn (3E). Bột TRH (Hình 4) có nhiều mảnh mô

mềm có tinh bột (4A), mảnh bản (4B), tế bào mô cứng vách dày (4C), sợi mô cứng khoang rộng (4F), mạch vách (4D) và mạch điểm (4E).

3.1.3 Định tính bằng sắc ký lớp mỏng so với mẫu chuẩn

Cả ba loại dược liệu LS, TRN, TRH đều có hiện các vết có màu sắc và giá trị R_f giống với các vết trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn (Hình 5). Từ các kết quả về cảm quan dược liệu, soi bột và định tính bằng SKLM so với mẫu chuẩn thì các mẫu dược liệu trong nghiên cứu hoàn toàn đồng nhất với các chỉ tiêu trong ĐĐVN V. Các nguyên liệu này đạt chất lượng để tiến hành nghiên cứu.

Bảng 1 Hiệu suất chiết cao (%)

Dược liệu	Khối lượng bột (g)	Độ ẩm bột (%)	Khối lượng cao (g)	Độ ẩm cao (%)	Hiệu suất (%)
LS	1 000	$5 \pm 0,02$	112,8	$11 \pm 0,03$	10,6
TRN	1 000	$10 \pm 0,03$	141,0	$10,8 \pm 0,04$	14
TRH	1 000	$6 \pm 0,02$	124,7	$9 \pm 0,03$	12,1

3.3 Khảo sát tỉ lệ của hỗn hợp cao chiết từ LS, TRN, TRH có hoạt tính ức chế enzym α -amylase và lipase tuyến tụy tốt nhất

Dựa trên IC_{50} từ 16 NT, phần mềm Design Expert 13 được sử dụng để xác định mối tương quan giữa các thành phần cao LS, TRN, và TRH nhằm dự đoán giá trị IC_{50} khi thay đổi tỉ lệ các thành phần này. Phương pháp phân tích hồi quy đa biến từ số liệu thực nghiệm cho thấy Y_1 và Y_2 (tương ứng IC_{50} của hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy) có sự khác biệt rõ giữa các NT. Những NT có tỉ lệ thành phần giống nhau như (NT1, NT2); (NT4, NT10); (NT5, NT9); (NT8, NT12); (NT11, NT16) có

3.2 Chiết xuất cao

Sau khi chiết xuất thu được lần lượt 112,8 g cao LS, 141 g cao TRN và 124,7 g cao TRH (Bảng 1). Độ ẩm bột, độ ẩm cao và hiệu suất chiết nằm trong phạm vi quy định của ĐĐVN V đối với mỗi loại dược liệu, chứng tỏ phương pháp chiết xuất phù hợp, cao chiết đạt tiêu chuẩn theo ĐĐVN V.

IC_{50} không chênh lệch nhiều. Việc lặp lại các NT ở giá trị biên và trung tâm giúp cho việc thiết lập mô hình dự đoán có độ chính xác cao hơn. Dữ liệu được phân tích hồi quy và tối ưu hóa bằng Design-Expert 13.

Kết quả phân tích hồi quy đa biến được thể hiện qua Bảng 2 và đồ thị với mặt đáp ứng (Hình 6). Mô hình được phân tích bằng ANOVA có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Với Y_1 , mô hình tối ưu có giá trị F là 44333,09 và $p < 0,001$, chỉ ra ý nghĩa thống kê cao. Giá trị F của sự thiếu phù hợp (lack of fit) là $1,290E-06$, không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,5770 > 0,05$), xác nhận tính hợp lệ của mô hình (Bảng 2).

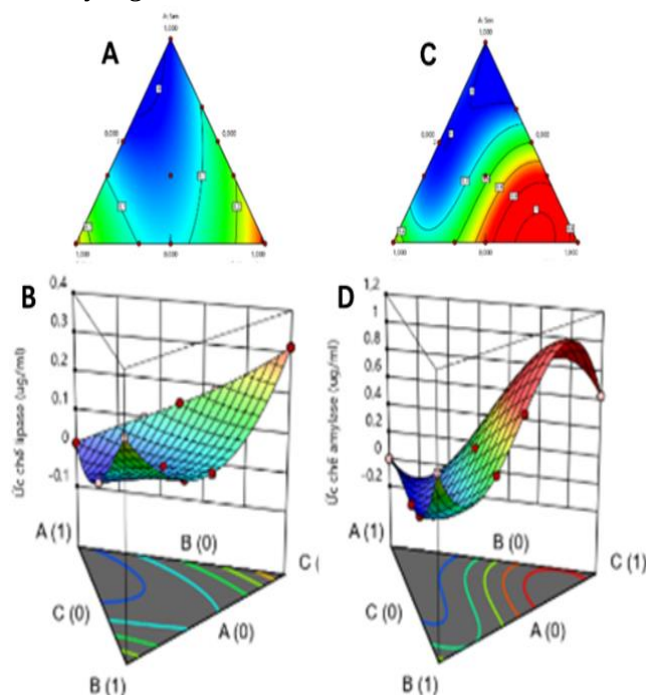
Bảng 2 Tổng hợp kết quả phân tích hồi quy tương quan giữa các biến X_1, X_2, X_3 và hàm mục tiêu Y_1, Y_2

Thông số	Y_1		Y_2	
	Giá trị F	Giá trị p	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình	44333,09	$< 0,0001$	6683,77	$< 0,0001$
AB	31226,20	$< 0,0001$	4506,21	$< 0,0001$
AC	3308,53	$< 0,0001$	156,82	$< 0,0001$
BC	5428,19	$< 0,0001$	19171,61	$< 0,0001$
ABC	43,63	0,0006		
AB(A-B)	1507,65	$< 0,0001$		
AC(A-C)	32338,65	$< 0,0001$	27,54	0,0008
BC(B-C)	19708,83	$< 0,0001$	12,48	0,0077
Sự thiếu phù hợp (Lack of fit)	0,3554	0,5770	1,94	0,2414
Độ lệch chuẩn	0,0018		0,0018	
Trung bình	0,3653		0,1302	
Hệ số xác định R^2	0,9930		0,9998	
Hệ số xác định R^2 đã điều chỉnh	0,9860		0,9997	
Phương trình hồi quy tương quan giữa các yếu tố	$Y_1 = 0,0072A + 0,5718B + 0,6245C - 1,10AB + 0,3407AC + 0,4594BC - 0,3656ABC + 1,13AB(A-B) - 3,17 AC(A-C) - 4,07BC(B-C)$		$Y_2 = 0,0159A + 0,2518B + 3114C - 0,4066AB - 0,0730AC - 0,7790BC - 0,1536AB(A-B) + 0,0636AC(A-C)$	

Tương tự với Y_2 , mô hình tối ưu có giá trị F là 6683,77 và giá trị $p < 0,001$ chỉ ra rằng mô hình hồi quy có ý nghĩa thống kê. Giá trị F cho sự thiếu phù hợp (lack of fit) là 1,94, không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,2414 > 0,05$). Hệ số xác định R^2 cao (0,9930 và 0,9998) và hệ số xác định R^2 đã điều chỉnh (0,9860 và 0,9997) chỉ ra mối tương quan tốt giữa kết quả thử nghiệm và dự đoán. Các hệ số trong phương trình được đánh giá thông qua giá trị p và $p < 0,05$ thể hiện sự ảnh hưởng đáng kể và có ý nghĩa thống kê [11]. Những hệ số có $p > 0,05$ sẽ được loại bỏ và xác định phương trình hồi quy tương quan của Y_1 , Y_2 . Trong đó, các hệ số tuyến tính (A, B và C), các hệ số thể hiện sự tương tác giữa các biến độc lập (AB, AC, BC, ABC) và các hệ số tương tác bậc hai (AB(A-B), AC(A-C) và BC(B-C)) đều có ý nghĩa với $p < 0,05$. Phù hợp lựa chọn ban đầu, phần mềm đề xuất mô hình Y_1 , Y_2 là hàm bậc 2, phụ thuộc vào tỉ lệ các thành phần: cao LS (X_1), cao TRN (X_2), cao TRH (X_3) và Y_1 , Y_2 được dự đoán bằng phương trình hồi quy tương ứng (Bảng 2).

Phân tích ANOVA được sử dụng để xây dựng mô hình dự đoán cho từng hàm mục tiêu, đánh giá ảnh hưởng và tương quan giữa các yếu tố (tỉ lệ cao LS, cao TRN và cao TRH) đến hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tuyến tụy. Hình 6 hiển thị đồ thị mặt đáp ứng về sự phân bố hoạt tính ức chế α -amylase và lipase, với các chấm rải rác biểu thị vị trí của từng NT theo khả năng ức chế.

NT có IC_{50} thấp nhất nằm trong vùng màu xanh dương, chuyển dần qua các màu sắc khác cho thấy khả năng ức chế enzyme giảm dần.



Hình 6 Đồ thị mặt đáp ứng thể hiện sự phân bố các nghiệm thức thử nghiệm theo hoạt tính ức chế α -amylase (5A, 5B) và lipase (5C, 5D)

Bảng 3 Dữ liệu thực nghiệm và dự đoán của các nghiệm thức

NT	Ma trận nghiệm thức			Dữ liệu thực nghiệm		Dữ liệu dự đoán	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
1	0	0	100	624,5	311,5	624,5	311,4
2	0	0	100	624,6	311,7	624,5	311,4
3	33,33	66,67	0	55,3	94,2	55,3	94,2
4	50	50	0	14,2	32,8	14	32,2
5	100	0	0	7,1	15,8	7,2	15,9
6	33,33	33,33	33,33	354,1	53,4	354,1	53,2
7	50	0	50	401,9	147,7	401	145,4
8	0	50	50	716	88,4	713	86,9
9	100	0	0	7,3	16,1	7,2	15,9
10	50	50	0	13,9	31,5	14	32,2
11	0	100	0	571,6	251,7	571,8	251,8
12	0	50	50	710	83,6	713	86,9
13	33,33	0	66,67	729,1	190,6	729,6	192
14	0	66,67	33,33	389,7	100,5	389,7	98,6
15	66,67	0	33,33	53	101,5	53,5	102,9
16	0	100	0	572	251,6	571,8	251,8

Kết quả phân tích mô hình tối ưu cho thấy điểm cực đại đạt được khi tỉ lệ cao LS, cao TRN và cao TRH lần lượt là 58,2 %, 36,6 % và 5,2 %. Tại điểm cực đại, IC₅₀ thấp nhất là 3 µg/mL đối với α-amylase và 8 µg/mL đối với lipase.

Bảng 4 Kết quả tối ưu, giá trị dự đoán và thực nghiệm kiểm chứng

Kết quả tối ưu		Hàm mục tiêu (µg/mL)	Giá trị dự đoán (µg/mL)	Thực nghiệm kiểm chứng (n = 3)	Bias (%)
Biến	Tỉ lệ (%)				
Cao LS (X ₁)	58,2	Y ₁	0,003	3,043 ± 0,074	0,0043
Cao TRN (X ₂)	36,6	Y ₂	0,008	8,183 ± 0,275	0,0183
Cao TRH (X ₃)	5,2				

Để kiểm tra kết quả, thí nghiệm được lặp lại 3 lần với thành phần các cao chiết tối ưu (52,8 % cao LS, 36,6 % cao TRN và 5,2 % cao TRH). IC₅₀ ức chế α-amylase kiểm chứng đạt (3,043 ± 0,074) µg/mL so với dự đoán là (3 ± 0,15) µg/mL; IC₅₀ ức chế lipase kiểm chứng đạt (8,183 ± 0,275) µg/mL so với dự đoán là (8 ± 0,04) µg/mL (Bảng 4). Giá trị dự đoán rất gần với giá trị thực nghiệm (bias nhỏ), cho thấy mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm và tỉ lệ các cao được liệu đã xác định là tối ưu để đạt hoạt tính ức chế α-amylase và lipase tốt nhất.

Bảng 5 Hoạt tính ức chế α-amylase và lipase của công thức tối ưu và đối chứng dương

Hoạt tính ức chế enzym (IC ₅₀ µg/mL)	Hỗn hợp cao chiết tối ưu		Chứng dương	
	Phương trình	IC ₅₀ (µg/mL)	Phương trình	IC ₅₀ (µg/mL)
α-amylase	y = 4008,3x + 37,992; R ² = 0,9917	3,043 ± 0,074	y = 2803,3x + 42,595; R ² = 0,9897	2,645 ± 0,138
	y = 3485,9x + 39,522; R ² = 0,9693		y = 2840,7x + 42,092; R ² = 0,9803	
	y = 3385,5x + 39,408; R ² = 0,9789		y = 2796,2x + 42,984; R ² = 0,9903	
Lipase	y = 217,02x + 48,233; R ² = 0,9672	8,183 ± 0,275	y = 28,684x + 3,1476; R ² = 0,9708	1,630 ± 0,004
	y = 208,82x + 48,23; R ² = 0,9744		y = 28,327x + 3,9417; R ² = 0,9776	
	y = 214,26x + 48,301; R ² = 0,9705		y = 28,114x + 4,1055; R ² = 0,9794	

Ngoài ra, acarbose và orlistat cũng được dùng làm đối chứng dương, IC₅₀ ức chế α-amylase của acarbose là (2,645 ± 0,138) µg/mL, chỉ gấp 1,15 lần so với hỗn hợp cao chiết tối ưu và IC₅₀ ức chế lipase của orlistat là (1,630 ± 0,004) µg/mL, gấp 5 lần so với hỗn hợp cao chiết (Bảng 5).

4 Bàn luận

Hoạt tính ức chế α-amylase và lipase của các dược liệu riêng lẻ có sự khác biệt rõ rệt. Đối với α-amylase, LS thể hiện hoạt tính mạnh nhất với IC₅₀ đạt 7,1 µg/mL, vượt trội hơn so với TRN và TRH có IC₅₀ lần lượt là 571,6 và 624,5 µg/mL, cho thấy LS có hoạt tính ức chế α-amylase mạnh hơn so với TRN và TRH. Khi kết hợp theo tỉ lệ 58,2 % LS, 36,6 % TRN và 5,2 % TRH, hoạt tính ức chế α-amylase tăng với IC₅₀ đạt 3,043 µg/mL,

cải thiện khoảng 2,3 lần so với LS đơn lẻ. Kết quả này cho thấy sự kết hợp giữa các dược liệu có hiệu quả hiệp đồng trong việc ức chế α-amylase. Tương tự, hoạt tính ức chế lipase cũng được cải thiện với IC₅₀ đạt 8,183 µg/mL khi kết hợp, tốt hơn khoảng 1,9 lần so với LS đơn lẻ. Điều này có thể liên quan đến sự kết hợp của các hợp chất hoạt tính trong mỗi dược liệu. Nhiều nghiên cứu trước đây đã báo cáo về khả năng ức chế các enzym tiêu hóa của LS, TRN và TRH. Thành phần flavonoid từ LS có khả năng ức chế lipase tuyến tụy lợn, α-amylase với IC₅₀ lần lượt là (0,38 ± 0,022) mg/mL và (1,86 ± 0,018) mg/mL [12]. Turmerin trong TRN ức chế hoạt động của α-amylase và α-glucosidase với IC₅₀ lần lượt là 31 µg/mL và 192 µg/mL [13]. Bisdemethoxycurcumin của Nghệ ức chế α-amylase

tuyến tụy của lợn và người lần lượt với IC_{50} là 0,026 mM và 0,025 mM [14]. Ngoài ra, curcumin là chất ức chế cạnh tranh đối với α -amylase với $IC_{50} = 51,32$ M [15]. TRH có khả năng ức chế tốt lipase và α -amylase tuyến tụy, ở nồng độ 2,5 mg/mL, cao chiết methanol và cao chiết nước đều cho khả năng ức chế cao hơn 90 % lipase và (70-90) % α -amylase [16]. Tuy nhiên, những nghiên cứu trước đây chỉ thực hiện trên từng loại dược liệu riêng lẻ, chưa có nghiên cứu nào kết hợp các dược liệu LS, TRN, TRH hoặc kết hợp các hợp chất chính của các dược liệu này để làm tăng hoạt tính ức chế enzym α -amylase và lipase. Nhận thấy tiềm năng, nghiên cứu này tiến hành đánh giá đồng thời hoạt tính ức chế α -amylase và lipase của từng dược liệu riêng lẻ và khi kết hợp chúng theo các tỉ lệ khác nhau và đã đề xuất hỗn hợp phối trộn với tỉ lệ 58,2 % LS, 36,6 % TRN và 5,2 % TRH giúp nâng cao hoạt tính ức chế α -amylase và lipase, cung cấp cơ sở cho việc lựa chọn

nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

5 Kết luận

Cao chiết LS thể hiện hoạt tính mạnh nhất với enzym α -amylase và lipase. Hỗn hợp cao chiết với 58,2 % cao LS, 36,6 % cao TRN và 5,2 % cao TRH có hoạt tính ức chế α -amylase và lipase tốt nhất, so với các nghiệm thức khảo sát. Kết quả kiểm chứng bằng thực nghiệm trên hỗn hợp cao chiết rất gần với dự đoán cho thấy mô hình dự đoán chính xác, đáng tin cậy và tính ứng dụng. Nghiên cứu sẽ tiếp tục khảo sát về tác dụng giảm cân và độc tính cấp của hỗn hợp cao chiết trên mô hình chuột hướng đến việc phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị béo phì trong tương lai.

Lời cảm ơn Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2023.01.114/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. P.C. Hsieh, W.Y. Chen, T.M. Wang and Y.L. Chu. (2023). Coptis chinensis, and extracts of guava and mulberry leaves present good inhibiting potential on obesity and associated metabolic disorders in high-fat diet obesity mice model. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(3), 270-276.
2. J. Maury, T. Issad, D. Perdureau, B. Gouhot, P. Ferre and J. Girard. (1993). Effect of acarbose on glucose homeostasis, lipogenesis and lipogenic enzyme gene expression in adipose tissue of weaned rats. *Diabetologia*, 36, 503-509.
3. N.N. Sun, T.Y. Wu and C.F. Chau. (2016). Natural dietary and herbal products in anti-obesity treatment. *Molecules*, 21(10), 1351.
4. A.S. Jabir and A.G. Iraby. (2014). Studying the effect of anti-amylase inhibitor extracted from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in treat diabetes and obesity in an affected mice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(3), 97-106.
5. A.A. Elegami, C. Bates, A.I. Gray, S.P. Mackay, G.G. Skellern and R.D. Waigh. (2003). Two very unusual macrocyclic flavonoids from the water lily *Nymphaea lotus*. *Phytochemistry*, 63(6), 727-731.
6. B. Huang, X. Ban, J. He, J. Tong, J. Tian and Y. Wang. (2010). Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*) leaves. *Food Chemistry*, 120(3), 873-878.
7. M.C. Lin, S.H. Kao, P.J. Chung, K.C. Chan, M.Y. Yang and C.J. Wang. (2009). Improvement for high fat diet-induced hepatic injuries and oxidative stress by flavonoid-enriched extract from *Nelumbo nucifera* leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5925-5932.
8. Y.S. Lee, K.W. Kim, B.R. Jin, D.S. Lee, W. Ko, H.M. Kim, ... and D.Y. Lee. (2023). The ethanolic extract of Korean *Curcuma longa* rhizome inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-induced obese mice via activating AMPK signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 110, 105854.
9. J. Han, P. Wu, Z. Xu, C. Liu, Q. Chen, F. Zhang, ... and H. Yu. (2024). The anti-cholestatic effects of *Coptis chinensis* Franch. alone and combined with *Tetradium ruticarpum* (A. Jussieu) TG Hartley: dual effects on fecal metabolism and microbial diversity. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1372527.
10. J. Wang, L. Wang, G.H. Lou, H.R. Zeng, J. Hu, Q.W. Huang, ... and X.B. Yang. (2019). Coptidis Rhizoma: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Pharmaceutical Biology*, 57(1), 193-225.



11. Z. Jeirani, B.M. Jan, B.S. Ali, I.M. Noor, S.C. Hwa and W. Saphanuchart. (2012). The optimal mixture design of experiments: Alternative method in optimizing the aqueous phase composition of a microemulsion. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 112, 1-7.
12. Bộ Y tế. (2018). Dược điển Việt Nam V. *Nhà xuất bản Y học*.
13. Đái Thị Xuân Trang (2019). Đánh giá khả năng kháng oxy hóa, ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các cao chiết từ lá cây núc nác (*Oroxylum indicum L.*). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 55(6), 29-36.
14. S. Kim and S.D. Lim. (2020). Separation and purification of lipase inhibitory peptide from fermented milk by *Lactobacillus plantarum* Q180. *Food Science of Animal Resources*, 40(1), 87.
15. S. Rosset and R.J. Tibshirani. (2020). From fixed-x to random-x regression: Bias-variance decompositions, covariance penalties, and prediction error estimation. *Journal of the American Statistical Association*, 115(529), 138-151.
16. S. Liu, D. Li, B. Huang, Y. Chen, X. Lu and Y. Wang. (2013). Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 263-269.
17. P.C. Lekshmi, R. Arimboor, K.G. Raghu and A.N. Menon (2012). Turmerin, the antioxidant protein from turmeric (*Curcuma longa*) exhibits antihyperglycaemic effects. *Natural Product Research*, 26(17), 1654-1658.
18. S. Ponnusamy, S. Zinjarde, S. Bhargava, P.R. Rajamohan and A. RaviKumar. (2012). Discovering Bisdemethoxycurcumin from *Curcuma longa* rhizome as a potent small molecule inhibitor of human pancreatic α -amylase, a target for type-2 diabetes. *Food Chemistry*, 135(4), 2638-2642.
19. M. Najafian. (2015). The effects of curcumin on alpha amylase in diabetics rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Science*, 17(12), 1-7.
20. T. Buchholz, C. Chen, X.Y. Zhang and M.F. Melzig. (2016). Pancreatic lipase and α -amylase inhibitory activities of plants used in Traditional Chinese Medicine (TCM). *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(7), 420-424.

Study on enhancing the inhibitory activity of pancreatic α -amylase and lipase enzymes of the mixture of *Nelumbo nucifera* leaves, *Curcuma longa* rhizomes and *Coptis chinensis* rhizomes

Le Thi Thu Trang*, Vo Ngoc To Trinh, Nguyen Hoai Nam

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

*ltttrang@ntt.edu.vn

Abstract Obesity is the cause of many diseases. Synthetic drugs such as orlistat and acarbose support weight loss through the inhibition of α -amylase and lipase but cause many side effects. Based on the results of recent studies on the weight loss effects of plants, the ratio of the mixture of extracts from *Nelumbo nucifera* leaves, *Curcuma longa* rhizomes, and *Coptis chinensis* rhizomes with the best inhibitory activity against pancreatic α -amylase and lipase was investigated by using Design-Expert 13 software and the D-Optimal model to design experiments with three independent variables: the percentage of the extracts: *Nelumbo nucifera* leaves (X_1), *Curcuma longa* rhizomes (X_2) and *Coptis chinensis* rhizomes (X_3). The objective functions Y_1 and Y_2 are the IC_{50} values representing the inhibitory activity of α -amylase and pancreatic lipase enzymes, respectively. The results proposed the optimal extract mixture (X_1 : 58.2 %, X_2 : 36.6 %, and X_3 : 5.2 %) and predicted $Y_1 = 3 \mu\text{g/mL}$ and $Y_2 = 8 \mu\text{g/mL}$ with $\alpha = 0.05$. Validation experiments showed that the IC_{50} inhibition of α - amylase and lipase enzymes of the optimal mixture was $(3.043 \pm 0.074) \mu\text{g/mL}$ and $(8.183 \pm 0.275) \mu\text{g/mL}$, compared to acarbose $(2.645 \pm 0.138) \mu\text{g/mL}$ and orlistat $(1.630 \pm 0.004) \mu\text{g/mL}$. The proposed extract mixture had the best α -amylase and lipase inhibitory activity compared to the investigated mixtures.

Keywords α -amylase , D-optimal, Design-Expert, Lipase, Obesity.

