



DOI:10.22144/ctujos.2024.348

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE Ở RUỘT NON CHUỘT *Mus musculus* CỦA CAO CHIẾT CÂY MẬT GẤU (*Gymnanthemum amygdalinum*)

Trương Thị Phương Thảo^{1,*}, Đái Thị Xuân Trang¹, Trần Chí Linh², Lê Thị Khánh Lan¹, Trần Lâm Trúc Mai¹ và Lê Hồng Phát¹

¹Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Bộ môn Hóa sinh, Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): truongthiphuongthao@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 25/04/2024

Sửa bài (Revised): 13/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/07/2024

Title: Investigation of the α -Glucosidase Inhibitory Activity of *Gymnanthemum amygdalinum* Extract in the Small Intestine of *Mus musculus*.

Author(s): Trương Thị Phương Thảo^{1,*}, Đái Thị Xuân Trang¹, Trần Chí Linh², Lê Thị Khánh Lan¹, Trần Lâm Trúc Mai¹ and Lê Hồng Phát¹

Affiliation(s): ¹Can Tho University, ²Nam Can Tho University

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm khảo sát thành phần hóa học và đánh giá khả năng ức chế enzyme α -glucosidase từ cao chiết thân và lá cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) đối với 2 nguồn enzyme: từ nấm men và enzyme trích từ ruột non chuột. Thành phần hóa học của cao chiết thân và lá có chứa các nhóm chất alkaloid, coumarin, polyphenol, tannin, flavonoid, saponin. Hàm lượng polyphenol tổng (252,3 \pm 1,47 mg GAE/g cao chiết) và flavonoid tổng (136,7 \pm 1,54 mg QE/g cao chiết) trong cao chiết thân cao hơn cao lá. Đồng thời, kết quả nghiên cứu chỉ ra cao chiết thân cho hiệu quả ức chế enzyme α -amylase (IC_{50} =124,22 \pm 1,83 μ g/mL) và α -glucosidase (IC_{50} =77,21 \pm 0,52 μ g/mL) mạnh hơn so với cao lá (IC_{50} =424,22 \pm 4,12 μ g/mL; IC_{50} =287,51 \pm 3,42 μ g/mL). Đối với khả năng gây ức chế hỗn hợp enzyme glucosidase ở ruột non chuột, phần trăm gây ức chế của cao lá khá thấp (<30% ở nồng độ 5.000 μ g/mL). Mặt khác, cao thân cho hiệu quả ức chế enzyme mạnh (IC_{50} =23,02 \pm 0,21 μ g/mL); thấp hơn acarbose 6 lần (IC_{50} =3,78 \pm 0,47 μ g/mL). Kết quả khảo sát chứng minh tiềm năng của cao chiết thân cây mật gấu trong điều trị bệnh đái tháo đường.

Từ khóa: Cây mật gấu, enzyme ruột non chuột, α -amylase, α -glucosidase

ABSTRACT

The study aims to investigate the chemical composition and assess the α -glucosidase inhibitory potential of stem and leaf extracts of *Gymnanthemum amygdalinum* against α -glucosidase enzymes derived from two sources: yeast and the small intestines of mice. The chemical composition of the stem and leaf extracts was found to contain alkaloids, coumarin, polyphenol, tannin, flavonoid, and saponin. The stem extracts' total polyphenol and flavonoid contents (252.3 \pm 1.47 mg GAE/g and 136.7 \pm 1.54 mg QE/g, respectively) were higher than the leaf extract. Similarly, the results showed that the stem extract exhibited stronger inhibitory effects on α -amylase (IC_{50} =124.22 \pm 1.83 μ g/mL) and α -glucosidase (IC_{50} =77.21 \pm 0.52 μ g/mL) compared to the leaf extract (IC_{50} =424.22 \pm 4.12 μ g/mL; IC_{50} =287.51 \pm 3.42 μ g/mL). Regarding the inhibitory effect on the glucosidase enzymes in the small intestine of mice, the inhibition percentage of the leaf extract was quite low (<30%, at a concentration of 5,000 μ g/mL). On the other hand, the stem extract exhibited strong inhibition with an IC_{50} of 23.02 \pm 0.21 μ g/mL, which was six times less potent than acarbose (IC_{50} =3.78 \pm 0.47 μ g/mL). The results demonstrate the potential of the stem extract of *Gymnanthemum amygdalinum* in treating diabetes.

Keywords: *Gymnanthemum amygdalinum*, small intestinal enzymes in mice, α -amylase, α -glucosidase

1. GIỚI THIỆU

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh mãn tính được đặc trưng bởi sự tăng glucose huyết, rối loạn chuyển hóa lipid, carbohydrate và protein do không thể đáp ứng insulin (Khan et al., 2019). Các nghiên cứu dịch tễ học và các thử nghiệm lâm sàng đã chứng minh việc kiểm soát tốt hàm lượng glucose huyết ở bệnh nhân ĐTĐ góp phần làm giảm các biến chứng và tỷ lệ tử vong liên quan đến bệnh ĐTĐ (Patel et al., 2008; Ismail-Beigi et al., 2010). Hiện nay, ức chế sự chuyển hóa carbohydrate và làm chậm quá trình hấp thu glucose sau khi ăn được xem là một trong những chiến lược để trị liệu bệnh ĐTĐ (Uzma et al., 2017). Quá trình ức chế sự chuyển hóa carbohydrate có thể được kiểm soát bằng cách ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase và α -amylase (Inzucchi, 2002; Sales et al., 2012).

Cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*), còn được biết đến với tên khoa học *Vernonia amygdalina*, thuộc họ Cúc Asteraceae, là một loài cây bụi sống lâu năm, sinh trưởng và phát triển tốt ở vùng nhiệt đới. Theo kinh nghiệm dân gian, cây mật gấu thường được sử dụng để chữa táo bón, tiêu chảy, vết thương ngoài da, ghê, bệnh giun đũa, viêm amidan, sốt và sốt rét (Swamy et al., 2015; Alaraet et al., 2017; Kaur et al., 2019). Ở Việt Nam, cây mật gấu khá phổ biến, dễ tìm, thường được trồng hoặc mọc hoang ở các khu vực Nam Bộ. Ở Nigeria, cây mật gấu được sử dụng phổ biến và có tác dụng hiệu quả trong điều trị ĐTĐ (Ijeh & Ejike, 2011; Toyang, 2013). Theo Kaur et al. (2019), cao chiết lá mật gấu có hàm lượng polyphenol, flavonoid cao, cho hiệu quả điều trị ĐTĐ đáng kể.

Hiện nay, phần lớn các nghiên cứu đánh giá tác dụng của dược liệu trong điều trị ĐTĐ chủ yếu dựa trên khả năng ức chế enzyme α -glucosidase *in vitro*. Mặc dù, enzyme α -glucosidase thương mại phân lập từ nấm men được sử dụng phổ biến làm vật liệu sàng lọc hiệu quả điều trị ĐTĐ của cây dược liệu, tuy nhiên kết quả đánh giá có thể chưa phản ánh trực tiếp được khả năng ức chế của dược liệu đối với enzyme α -glucosidase trong hệ tiêu hóa động vật. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm so sánh hoạt tính gây ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết cây mật gấu đối với cả 2 nguồn gồm enzyme α -glucosidase thương mại, và enzyme trích từ ruột non chuột *Mus musculus*, nhằm nghiên cứu rõ hơn tác động gây ức chế của cao chiết dược liệu đối với hoạt động của enzyme α -glucosidase trong hệ tiêu hóa *in vivo*.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện

Vật liệu: Mẫu cây mật gấu (*Gymnanthemum amygdalinum*) được thu vào tháng 4 năm 2023 ở huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ. Mẫu cây được định danh tại Phòng thí nghiệm Thực vật và Động vật (Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ), dựa vào đặc điểm hình thái thực vật theo tài liệu Cây cỏ Việt Nam (Hộ, 1999).

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: máy ly tâm (Mikro 12-24, Hettich, Đức), máy vortex (ZX3, Velp, Ý), micropipette 100 μ L, 1000 μ L (Thermol Labsystems), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Nhật bản), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức), Cân phân tích (Mettler, Mỹ), Máy đo pH để bàn (Consort, Bỉ), Tủ sấy (Heraeus, Đức) và một số thiết bị khác.

Hóa chất: Ethanol (EtOH) (Cemaco), Na_2CO_3 (Merck), gallic acid (Merck), quercetin (Merck), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck), 3,5-Dinitrosalicylic acid (India), $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Guangdong), FeCl_3 (Sigma-Aldrich), NaNO_2 (Xilong), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Xilong), enzyme α -amylase (Sigma-Aldrich), enzyme α -glucosidase (Sigma-Aldrich), acarbose (Sigma-Aldrich) và một số hóa chất khác.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Điều chế cao ethanol tổng

Cây mật gấu được phân ra thành lá và thân, rửa sạch, và loại bỏ phần bị hư. Mẫu được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu thân và lá sau khi khô được xay nhuyễn thành bột dược liệu thân và lá tương ứng. Phần bột của thân và lá lần lượt được cho vào trong túi vải và ngâm trong ethanol (EtOH). Mỗi lần ngâm kéo dài khoảng 24 giờ, mẫu được ngâm 5 lần. Dịch chiết từ các lần ngâm được cô đuổi dung môi, thu được cao EtOH tổng của thân và lá cây mật gấu (Phụng, 2007).

Ấm độ của các mẫu bột dược liệu được xác định bằng cách dùng sức nóng làm bay hết hơi nước trong dược liệu. Xác định khối lượng trước và sau khi sấy khô, từ đó tính ra phần trăm nước có trong dược liệu. Sấy 3 đĩa thủy tinh ở 105°C trong 15 phút đến khi khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Cân chính xác 1 g bột dược liệu vào đĩa thủy tinh và xác định khối lượng trước khi sấy. Sau đó, đĩa thủy tinh có chứa mẫu bột dược liệu khô được sấy ở 105°C trong 2 giờ đến khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Độ ẩm trong mẫu bột dược liệu được tính theo công thức như sau:

$$\text{Độ ẩm (\%)} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100.$$

Trong đó: m_0 (g) là khối lượng đĩa thủy tinh sau khi sấy, m_1 (g) là khối lượng đĩa thủy tinh sau khi thêm bột dược liệu, m_2 (g) là khối lượng đĩa thủy tinh và dược liệu sau khi sấy (Bộ Y Tế, 2009).

2.2.2. Định tính thành phần hóa học trong các cao chiết cây mật gấu

Nhóm hợp chất như alkaloid, flavonoid, coumarin, phenolic, tannin, flavonoid, quinone, terpenoid, saponin được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên (Phụng, 2007). Các bước tiến hành định tính được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp định tính các hợp chất

Hợp chất	Thực hiện phản ứng định tính	Kết quả phản ứng
Alkaloid	2 mL dịch chiết + vài giọt Mayer/ Wagner	Kết tủa trắng hoặc vàng nhạt
Coumarin	2 mL dịch chiết + 3 mL NaOH 10%	Xuất hiện màu vàng
Phenolic	2 mL dịch chiết + 2 mL H ₂ O + 2-3 giọt FeCl ₃ (10%)	Kết tủa màu xanh đen
Tannin	2 mL dịch chiết + 5 giọt gelatin	Kết tủa bông trắng
Flavonoid	1 mL dịch chiết + vài giọt H ₂ SO ₄ đậm đặc	Kết tủa vàng đậm đến cam, màu đỏ hoặc xanh dương-đỏ hoặc từ cam đến đỏ
Quinone	2 mL dịch chiết + vài giọt HCl đậm đặc	Xuất hiện màu xanh lá cây
Terpenoid	2 mL dịch chiết + 2 mL chloroform + vài giọt H ₂ SO ₄ đậm đặc	Xuất hiện màu xanh ngọc
Saponin	1 mL dịch chiết + 5 mL nước cất + 3-4 giọt ethanol. Lắc đều để yên 15 phút	Cột bọt trắng bền vẫn còn sau khi để yên 15 phút

2.2.3. Định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong các cao chiết cây mật gấu

Phương pháp định lượng polyphenol

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton et al. (1999) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250 µL cao chiết trong 250 µL nước và 250 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250 µL Na₂CO₃ 10% rồi ủ 30 phút ở 40°C trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm. Gallic acid (nồng độ 0-20 µg/mL) được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol trong các cao chiết thân và lá cây mật gấu được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid.

Phương pháp định lượng flavonoid

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu AlCl₃ của Bag et al. (2015) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL cao chiết ở nồng độ khảo sát pha trong 1 mL nước, lắc đều. Cho 200 µL dung dịch NaNO₂ 5% vào hỗn hợp phản ứng. Sau 5 phút, thêm 200 µL AlCl₃ 10%, lắc đều. Sau 6 phút, thêm 2 mL NaOH 1 M vào hỗn hợp. Cuối cùng hỗn hợp phản ứng được thêm nước cho đủ 5 mL. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin

(nồng độ 0-100 µg/mL) được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao chiết thân và lá cây mật gấu được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

2.2.4. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase, α-amylase in vitro

Phương pháp ức chế enzyme α-amylase

Khả năng ức chế sự thủy phân tinh bột của các cao chiết cây mật gấu được thực hiện theo phương pháp của Akkarachiyasit et al. (2010) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm có 50 µL dung dịch đệm phosphate (pH=7) với 50 µL cao chiết và 50 µL enzyme α-amylase (3 U/mL) được đem ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 phút. Sau đó, 50 µL tinh bột (2 mg/mL) được cho vào hỗn hợp trên và tiếp tục ủ 37°C trong 15 phút. Tiếp theo, 200 µL dung dịch HCl đậm đặc được thêm vào để ngừng phản ứng. Cuối cùng, 300 µL dung dịch thuốc thử iod (5 mM I₂ và 10 mM KI pha trong 0,1 M HCl) được thêm vào để nhận biết lượng tinh bột còn dư sau phản ứng dựa trên phản ứng màu xanh đặc trưng. Hỗn hợp trên được đo độ hấp thụ quang phổ của phức hợp tinh bột-iod ở bước sóng 660 nm. Acarbose (nồng độ 0-10 µg/mL) được sử dụng như đối chứng dương.

$$\text{Phần trăm bị ức chế (\%)} = 100 - ((A_0 - A_1) / A_0 \times 100)$$

Với: A_0 : độ hấp thụ quang phổ của dung dịch đối chứng. A_1 : độ hấp thụ quang phổ của dung dịch sau phản ứng.

Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase của các cao chiết cây mật gấu được xác định dựa vào nồng độ mà tại đó cao chiết hay chất chuẩn ức chế được 50% hoạt động của enzyme.

Phương pháp ức chế enzyme α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao chiết cây mật gấu được thực hiện theo phương pháp của Shai et al. (2011) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng chứa 100 μ L dung dịch đệm phosphate (100 mM, pH=6,8), 20 μ L enzyme α -glucosidase (1 U/mL), và 40 μ L cao chiết. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, 40 μ L *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (5 mM) được thêm vào và ủ thêm ở 37°C trong 20 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 100 μ L Na₂CO₃ (0,1 M). Độ hấp thụ quang phổ của hợp chất *p*-nitrophenol giải phóng được đo tại bước sóng 405 nm. Acarbose được sử dụng như chất chuẩn.

Kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm ức chế, được tính bằng công thức:

$$\text{Hoạt động ức chế (\%)} = (1 - A_0/A_1) \times 100.$$

Với: A_0 : độ hấp thụ quang phổ của dung dịch đối chứng. A_1 : độ hấp thụ quang phổ của dung dịch sau phản ứng.

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao chiết cây mật gấu được xác định dựa vào nồng độ mà tại đó cao chiết hay chất chuẩn ức chế được 50% hoạt động của enzyme.

2.2.5. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase ở ruột non chuột của cao chiết cây mật gấu

Chuột nhắt trắng (*Mus musculus*) (chuột đực, cân nặng 30 – 35 g) được cung cấp từ Phòng thí nghiệm Sinh học động vật, Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự Nhiên. Chuột được nuôi ổn định một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Chuột gồm 15 con được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm (5 con/nhóm) dùng đánh giá hiệu quả gây ức chế của cao chiết thân, lá và chất chuẩn đối với hỗn hợp enzyme glucosidase ly trích từ ruột non chuột. Chuột được cho nhịn ăn 20 giờ trước khi thực hiện giải phẫu. Chuột được gây mê bằng diethyl ether (C₂H₅)₂O tắm bông gòn lượng vừa đủ trong 5-7 phút.

Mẫu ruột non của chuột được lấy ở vị trí dưới tá tràng và trên mang tràng (40±2 cm), rửa bằng dung

dịch nước muối sinh lý (lạnh). Mẫu ruột non được cân trọng lượng và đem trữ đông ở nhiệt độ -30°C. Phương pháp chiết hỗn hợp enzyme α -glucosidase ở ruột non được thực hiện theo Malunga et al. (2016) có hiệu chỉnh. Ruột non (1 g) được nghiền đồng nhất trong 10 mL dung dịch đệm phosphate (pH 6,9; 0,1 M) bằng máy nghiền mẫu (Homogenizing mixer, Nhật Bản), thao tác nghiền được thực hiện trong điều kiện lạnh. Hỗn hợp dịch nghiền đồng nhất được đem ly tâm ở 10000 g, 4°C, trong vòng 10 phút. Phần dịch lỏng thu được sau ly tâm chứa hỗn hợp dịch enzyme α -glucosidase, được sử dụng cho các thí nghiệm đánh giá hiệu quả gây ức chế của cao chiết/chất chuẩn đối với hỗn hợp enzyme α -glucosidase ly trích từ ruột non chuột trong nghiên cứu này.

Phương pháp khảo sát hoạt tính ức chế hỗn hợp dịch enzyme α -glucosidase từ ruột non chuột của cao chiết được thực hiện theo Malunga et al. (2016) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 50 μ L dịch enzyme α -glucosidase trong ruột chuột với 100 μ L mẫu hoặc dung dịch đệm (đối chứng) và ủ ở 37°C trong 5 phút. 50 μ L dung dịch sucrose 20 mM được thêm vào và ủ thêm trong 60 phút. Hỗn hợp được ủ ở 95°C trong 10 phút để làm dừng hoạt động của enzyme. Sau khi ly tâm ở 10000 g trong 10 phút, phần dịch lỏng sau ly tâm được thu để đo hàm lượng glucose sau phản ứng theo phương pháp của Miller (1959).

Kết quả được biểu thị dưới dạng phần trăm ức chế, được tính bằng công thức:

$$\text{Hoạt động ức chế (\%)} = 100 - [(A_1 - A_0)/(B_1 - B_0)] \times 100.$$

Với

A_0 : độ hấp thụ quang phổ của mẫu chứa cao chiết (không có sucrose và dịch enzyme);

A_1 : độ hấp thụ quang phổ của mẫu chứa cao chiết, dịch enzyme và sucrose;

B_0 : độ hấp thụ quang phổ của mẫu chứa sucrose (không có cao chiết và dịch enzyme);

B_1 : độ hấp thụ quang phổ của mẫu chứa dịch enzyme và sucrose (không có cao chiết);

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao chiết cây mật gấu được xác định dựa vào nồng độ mà tại đó cao chiết hay chất chuẩn ức chế được 50% hoạt động của enzyme. Acarbose được sử dụng như chất đối chứng dương.

2.2.6. Thống kê phân tích số liệu

Các thử nghiệm được lập lại ít nhất ba lần và số liệu được trình bày bằng giá trị trung bình ± sai số chuẩn. Các kết quả được phân tích bằng phần mềm Minitab 16.0 (So sánh 2 trung bình t-test, và ANOVA (one-way, thử nghiệm (Tukey)).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chiết cao tổng

Cao chiết ethanol (EtOH) của lá và thân thu được có màu xanh lá đậm. Cao sau khi cô quay có màu xanh đen đậm, độ nhầy cao và ở trạng thái đặc sệt. Kết quả khối lượng cao thu được và hiệu suất ly trích được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hiệu suất chiết cao

Bộ phận	Độ ẩm (%)		Hiệu suất chiết cao (%)	
	Mẫu tươi	Bột	Mẫu tươi	Bột
Thân	68,5	7,13	1,4	4,2
Lá	75,1	4,87	4,8	11,2

Mỗi bộ phận của cây mật gấu cho giá trị ẩm độ và hiệu suất ly trích khác nhau. Cây mật gấu tươi có lượng nước dao động từ 68,5% (ở thân) đến 75,10% (ở lá). Trong khi đó, độ ẩm của các mẫu bột được liệu cũng có sự biến động theo từng bộ phận. Thân là bộ phận chứa hàm lượng nước ít thì bột được liệu của thân lại có ẩm độ cao 7,13%. Trong khi đó, lá lúc chưa xử lý có độ ẩm đạt 75,10% thì bột được liệu lúc này độ ẩm chỉ còn 4,87%. Các mẫu bột được liệu của cây mật gấu sau khi xử lý có độ ẩm đạt được yêu cầu theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam IV (độ ẩm bột được liệu ≤15%) và Dược điển Việt Nam V (độ ẩm bột được liệu ≤9%).

Kết quả cho thấy bột được liệu từ lá mật gấu cho hiệu suất ly trích (11,2%) cao hơn bột được liệu từ thân cây mật gấu (4,2%). Các cao chiết thu được từ các mẫu bột được liệu của cây mật gấu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và dùng cho các khảo sát tiếp theo.

3.2. Kết quả định tính thành phần hóa học trong các cao chiết cây mật gấu

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học có trong cao chiết lá và thân cây mật gấu được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy cả cao chiết lá và thân cây mật gấu đều có sự hiện diện của alkaloid, coumarin, phenolic, tannin, flavonoid và saponin. Bên cạnh đó, các hợp chất như alkaloid, coumarin, polyphenol, tannin và saponin hiện diện rất rõ ở cao chiết thân mật gấu. Trong nghiên cứu về thành phần

các hợp chất ở thân cây mật gấu của Inusa et al. (2018), cho thấy sự hiện diện rất rõ của saponin, phenolic, alkaloid, và tannin, tương đồng với kết quả định tính trong nghiên cứu này. Mặt khác, chỉ có alkaloid và coumarin hiện diện rõ ở cao chiết lá mật gấu. Tuy nhiên, quinone, terpenoid lại không tìm thấy ở cả hai loại cao chiết lá và thân cây mật gấu. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu trước đây của Ijeh and Ejike (2011) và Michael et al. (2010).

Theo nghiên cứu của Ali et al. (2019), cao chiết lá cây mật gấu chứa hàm lượng các nhóm hợp chất sinh học gồm saponin (27 mg/g), alkaloid (46 mg/g), flavonoid (122 mg/g), terpenoid (17 mg/g), tannin (12 mg/g), steroid (48 mg/g), và phenol (36 mg/g). Ngoài ra, theo như kết quả nghiên cứu của Eyong et al. (2011) cho thấy trong dịch chiết thân và rễ của cây mật gấu ước tính có chứa hàm lượng các hợp chất thứ cấp tính theo tỉ lệ phần trăm (%) lần lượt như sau: saponin (13,21±0,02% và 28,52±0,03%), flavonoid (1,02±0,04% và 0,51±0,05%), alkaloid (7,02±0,04% và 6,11±0,02%) hydrocyanic acid (3,41±0,02% và 1,18±0,05%). Qua đó, có thể nhận thấy cao chiết thân và lá cây mật gấu có chứa nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp, tương đồng với các nghiên cứu trước đây. Điều này chứng minh được cây mật gấu là loại dược liệu có nhiều tiềm năng về hoạt tính sinh học.

Bảng 3. Kết quả định tính các hợp chất

Hợp chất	Cao chiết lá	Cao chiết thân
Alkaloid	++	++
Coumarin	++	++
Phenolic	++	+
Tannin	++	+
Flavonoid	+	+
Quinone	-	-
Terpenoid	-	-
Saponin	++	+

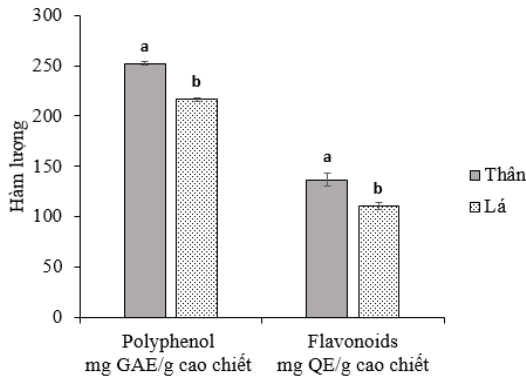
Ghi chú: (-): Không hiện diện; (+): Có hiện diện; (++) : Hiện diện rất rõ

3.3. Kết quả định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong các cao chiết cây mật gấu

Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết (Hình 1) được xác định dựa vào phương trình chất chuẩn là gallic acid và quercetin.

Polyphenol là hợp chất có nhiều trong các loài thực vật được dùng làm dược liệu. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng polyphenol có hoạt tính kháng oxy hóa, chống lão hóa và có nhiều hoạt tính chữa bệnh

trên người (Tungmunnithum et al., 2018). Kết quả khảo sát cho hàm lượng polyphenol ở cao chiết thân và lá cây mật gấu lần lượt là 252,3 mg GAE/g cao chiết và 216,51 mg GAE/g cao chiết. Hàm lượng polyphenol của cao chiết thân cao hơn cao chiết lá. Hàm lượng polyphenol của các loại cao chiết giữa thân và lá cây mật gấu có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$). Kết quả này phù hợp với kết quả định tính về sự hiện diện của các hợp chất phenolic trong cao chiết thân rõ rệt hơn cao chiết lá (Bảng 3).



Hình 1. Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các cao chiết thân và lá cây mật gấu.

Flavonoid là một nhóm các hợp chất tự nhiên được tìm thấy trong thực vật, hiện diện hầu như ở tất cả các bộ phận của cây. Flavonoid có hiệu quả kháng oxy hóa, bảo vệ gan, kháng khuẩn, kháng viêm, chống ung thư và kháng virus (Yao et al., 2004; Shashank & Abhay, 2013). Kết quả thử nghiệm cho thấy cao chiết thân có hàm lượng flavonoid (136,70 mg QE/g cao chiết) cao hơn hàm lượng flavonoid của cao chiết lá (110,44 mg QE/g cao chiết). Hàm lượng flavonoid của cao chiết thân và lá khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Kết quả định lượng phù hợp với kết quả định tính thành phần các nhóm hợp chất (các mẫu cao đều có flavonoid) (Bảng 3).

3.4. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase của các cao chiết cây mật gấu *in vitro*

Các hoạt chất từ thực vật có khả năng ức chế enzyme α -amylase và enzyme α -glucosidase được sử dụng như một nhóm thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ bằng cách ngăn chặn sự thủy phân các dạng carbohydrate thành đường đơn nhằm kiểm soát được lượng glucose huyết (Zhenhua et al., 2014). Khả năng ức chế enzyme α -amylase và enzyme α -glucosidase *in vitro* của các mẫu thử trình bày ở Bảng 4, cho thấy hoạt tính ức chế enzyme ở cả enzyme α -amylase và enzyme α -glucosidase của

cao chiết thân mạnh hơn cao chiết của lá. Cụ thể, khả năng ức chế của enzyme α -amylase và enzyme α -glucosidase ở cao chiết của thân cây mật gấu lần lượt là $IC_{50} = 124,22 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$ và $IC_{50} = 77,21 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$, mạnh hơn cao chiết của lá 3,41 lần đối với khả năng ức chế enzyme α -amylase ($IC_{50} = 424,22 \pm 4,12 \mu\text{g/mL}$) và 3,72 lần đối với enzyme α -glucosidase ($IC_{50} = 287,51 \pm 3,42 \mu\text{g/mL}$). Tinh chất acarbose được xác định là có hoạt tính ức chế enzyme α -amylase ($IC_{50} = 22,10 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$) và α -glucosidase ($IC_{50} = 4,67 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$) mạnh hơn cao chiết thân mật gấu lần lượt là 5,63 và 12,20 lần.

Bảng 4. Khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các cao chiết cây mật gấu

Mẫu thử	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	α -amylase	α -glucosidase
Lá	$424,22 \pm 4,12^a$	$287,51 \pm 3,42^a$
Thân	$124,22 \pm 1,83^b$	$77,21 \pm 0,52^b$
Acarbose	$22,10 \pm 0,20^c$	$4,67 \pm 0,13^c$

Ghi chú: Các chữ cái theo sau giá trị trung bình giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Như vậy, nghiên cứu cho thấy, cao chiết thân cây mật gấu giàu polyphenol và flavonoid có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase mạnh hơn cao chiết của lá. Từ đó, hàm lượng polyphenol và flavonoid được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase. Nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy, các cao chiết thực vật có hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase phụ thuộc vào polyphenol (Kwon et al., 2008; Kang et al., 2014). Ngoài ra, flavonoid là một nhóm chính của các hợp chất polyphenol đã được báo cáo là có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase (Kim et al., 2000; Tadera et al., 2006; Williams, 2013). Sự ức chế hoạt động enzyme tăng đáng kể với sự gia tăng số lượng nhóm hydroxyl của các polyphenol và flavonoid (Tadera et al., 2006). Các nhóm hydroxyl trong cấu trúc phân tử flavonoid có thể hình thành liên kết hydro với các nhóm -OH của enzyme, giúp cản trở phản ứng giữa enzyme α -amylase và tinh bột và sẽ ức chế quá trình thủy phân tinh bột (Gu et al., 2015). So sánh hiệu quả ức chế α -amylase và α -glucosidase của các cao chiết cây mật gấu với chất chuẩn acarbose dựa vào giá trị IC_{50} cho thấy cao chiết thể hiện hoạt tính kém hơn chất chuẩn. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng các cao chiết cây mật gấu có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn α -amylase. Một số nghiên cứu cho thấy chất ức chế α -glucosidase đóng vai trò

chính trong việc kiểm soát glucose huyết sau bữa ăn ở bệnh nhân ĐTĐ (Javed et al., 2011).

3.5. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase ở ruột non chuột của cao chiết cây mật gấu

Mặc dù nguồn enzyme α -glucosidase thương mại phân lập từ nấm men được sử dụng rộng rãi làm vật liệu sàng lọc các chất ức chế α -glucosidase, tuy nhiên kết quả đánh giá có thể không tương thích với hệ enzyme trên cơ thể động vật có vú. Vì vậy, nghiên cứu này đã tiến hành ly trích dịch enzyme α -glucosidase từ ruột non của chuột, nhằm khảo sát được liệu có hoạt tính gây ức chế enzyme α -glucosidase trực tiếp trong hệ tiêu hóa của động vật, tương đồng hơn với điều kiện *in vivo*.

Nhằm xác định hỗn hợp enzyme ly trích từ ruột non chuột có hoạt tính enzyme glucosidase, nghiên cứu này tiến hành đánh giá hoạt tính của của dịch enzyme glucosidase bằng phản ứng thủy phân đường sucrose thành glucose (Malunga et al., 2016). Kết quả được thể hiện trong Bảng 5. Kết quả đánh giá hoạt tính enzyme glucosidase cho thấy rằng, hỗn hợp enzyme trích từ ruột non chuột có khả năng thủy phân đường sucrose thành glucose, thông qua đo độ

hấp thụ quang phổ của glucose sau phản ứng của dịch enzyme và sucrose (OD tăng chứng tỏ enzyme đã thủy phân sucrose thành glucose). Điều này chứng tỏ hỗn hợp enzyme trích được từ ruột non chuột có sự hiện diện của enzyme glucosidase (Bảng 5).

Ngoài ra, nghiên cứu này đã tiến hành so sánh hoạt tính của dịch enzyme glucosidase trích từ ruột non của 3 nhóm nghiệm thức (NT) chuột, trước khi khảo sát hiệu quả gây ức chế enzyme của các mẫu thử (cao thân, cao lá và acarbose) đối với enzyme glucosidase đã ly trích. Kết quả Bảng 5 cho thấy dịch enzyme trích được từ 3 nhóm NT chuột ban đầu (cao thân, cao lá, acarbose) thể hiện hoạt tính của enzyme glucosidase tương đương nhau, không khác biệt về mặt thống kê ($P=0,205>0,05$). Dịch enzyme trích được từ ruột non chuột ban đầu ở các nhóm NT cao thân, cao lá, và acarbose có hiệu quả thủy phân sucrose với phần trăm hoạt tính tương đương nhau lần lượt là 67,95%, 67,67% và 65,7%. Kết quả nghiên cứu chứng minh hoạt tính của enzyme glucosidase trích từ ruột non của 3 nhóm NT chuột ban đầu là tương đương nhau, không ảnh hưởng đáng kể đến khảo sát gây ức chế enzyme glucosidase của các mẫu thử gồm cao thân, cao lá, và acarbose.

Bảng 5. Đánh giá hoạt tính của dịch enzyme glucosidase trích từ ruột non chuột

Độ hấp thụ của glucose (540 nm)	Dịch nghiên ruột non chuột		
	Nghiệm thức cao thân	Nghiệm thức cao lá	Nghiệm thức acarbose
Mẫu phản ứng (enzyme và sucrose)	0,731±0,023 ^a	0,734±0,021 ^a	0,713±0,016 ^a
Mẫu trắng (sucrose)	0,052±0,005 ^a	0,058±0,002 ^a	0,056±0,005 ^a
Hoạt tính của enzyme (%)	67,95±2,32 ^a	67,67±2,11 ^a	65,7±1,61 ^a

Các chữ cái theo sau giá trị trung bình giống nhau trong cùng một dòng thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Nồng độ cao chiết của thân cây mật gấu có hiệu quả gây ức chế dịch enzyme α -glucosidase trích từ ruột non chuột được xác định ở dãy nồng độ 1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; và 50 $\mu\text{g/mL}$. Mặt khác, cao chiết lá cây mật gấu thể hiện phần trăm gây ức chế đối với với hỗn hợp enzyme α -glucosidase ở dãy nồng độ gấp 100 lần cao chiết thân (125; 250; 500; 1000; 1500; 2000; 2500; 5000 $\mu\text{g/mL}$) (Bảng 6).

Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết thân cho hiệu quả gây ức chế hỗn hợp dịch enzyme α -glucosidase ruột non, tăng tuyến tính theo nồng độ thử nghiệm với phần trăm gây ức chế là 10,44 đến 91,32% ($y=1.674x+11.033, R^2= 0.9899$). Tuy nhiên, cao chiết lá cho kết quả gây ức chế enzyme rất yếu (<30%) ở nồng độ khảo sát cao nhất của thử nghiệm (5.000 $\mu\text{g/mL}$). Hiệu quả ức chế dịch enzyme α -glucosidase chiết từ ruột non chuột của cao chiết thân và lá được đánh giá dựa trên giá trị IC_{50} (xác định ở nồng độ gây ức chế 50% hoạt động của

enzyme dựa trên phương trình hồi quy của cao chiết) (Bảng 6). Trong đó, cao chiết thân gây ức chế 50% hoạt động của hỗn hợp enzyme α -glucosidase với giá trị $IC_{50}=23,02\pm0,21 \mu\text{g/mL}$, ngược lại cao chiết lá không gây ức chế được 50% hoạt động của enzyme ở nồng độ khảo sát cao nhất của cao chiết (5000 $\mu\text{g/mL}$). Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase trên ruột non chuột của các cao chiết cây mật gấu có sự tương đồng với hàm lượng polyphenol và flavonoid. Cao chiết thân có hàm lượng polyphenol và flavonoids nhiều hơn cao chiết lá, tỉ lệ thuận với hiệu quả ức chế enzyme α -glucosidase trong ruột non chuột ở cao chiết thân. Bộ phận dùng của cây dược liệu cùng với các hàm lượng hoạt chất thứ cấp có trong cao chiết, tương tác giữa các hợp chất sinh học với nhau, có thể là nguyên nhân gây tác động đến hiệu quả gây ức chế enzyme α -glucosidase ở ruột non động vật.

Bảng 6. Hiệu quả gây ức chế dịch enzyme glucosidase trích từ ruột non chuột của cao chiết thân và lá cây mật gấu

Cao chiết thân		Cao chiết lá		Acarbose	
Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế (%)	Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế (%)	Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế (%)
1,25	10,44±0,31 ^g	125	4,64±0,11 ^c	0,125	19,90±0,20 ^h
2,5	13,72±0,25 ^g	250	7,68±0,23 ^c	0,25	25,90±0,45 ^g
5	18,46±0,30 ^f	500	10,74±0,21 ^c	0,50	26,77±0,37 ^f
10	27,54±0,29 ^e	1000	12,12±0,37 ^b	1	31,45±0,42 ^e
15	37,54±0,38 ^d	1500	14,48±0,18 ^b	2	37,80±0,11 ^d
20	48,62±0,91 ^c	2000	15,52±1,45 ^b	4	53,40±0,73 ^c
25	56,16±0,55 ^b	2500	20,42±1,29 ^a	8	78,73±0,51 ^b
50	91,32±2,01 ^a	5000	24,92±0,74 ^a	10	94,65±0,73 ^a
y = 1.674x + 11.033 (R ² =0.9899)		y = 0.0039x + 7.5462 (R ² = 0.9024)		y = 7.1542x + 22.936 (R ² = 0.9953)	
IC ₅₀ =23,02±0,21 ^A (µg/mL)		Phần trăm gây ức chế enzyme yếu <30% ở nồng độ 5000 µg/mL		IC ₅₀ =3,78±0,47 ^B (µg/mL)	

Các chữ cái theo sau giá trị trung bình giống nhau trong cùng một cột (in thường), hoặc trong cùng một dòng (in hoa) thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Trong nghiên cứu này, qua kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase từ ruột non của chuột của các cao chiết/chất chuẩn bằng phương pháp thủy phân đường sucrose (Malunga et al., 2016) và đo lường hàm lượng glucose tạo ra (Miller, 1959); bước đầu cho thấy hỗn hợp trích từ ruột non của chuột có sự hiện diện của enzyme α-glucosidase (Bảng 5 và Bảng 6). Để xác định chính xác sự hiện diện của enzyme α-glucosidase (sucrase, maltase...) trong hỗn hợp trích được, các nghiên cứu tiếp theo cần tiến hành phân tích điện di SDS-PAGE.

Enzyme α-glucosidase được sử dụng trong nghiên cứu này có mối liên quan chặt chẽ về mặt cấu trúc và cơ học với enzyme của con người, vì đây là những enzyme được ly trích từ ruột non rất thích hợp cho việc bố trí thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng ĐTĐ *in vitro*. Một tác nhân ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase có thể hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ bằng cách ngăn chặn thủy phân carbohydrate thành đường đơn, giúp kiểm soát cân bằng glucose huyết (Zhenhua et al., 2014). Nghiên cứu này cho thấy được tiềm năng của việc sử dụng cao chiết thân cây mật gấu giàu polyphenol và flavonoid, là một tác nhân kháng ĐTĐ đầy hứa hẹn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akkarachiyasit, S., Charoenlertkul, P., Yibchok-Anun, S., & Adisakwattana, S. (2010). Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal

4. KẾT LUẬN

Các cao chiết cây mật gấu được định tính sơ bộ thành phần hóa học, định lượng polyphenol và flavonoid, khảo sát khả năng ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase *in vitro*, và enzyme tiêu hóa α-glucosidase ly trích từ ruột non chuột. Kết quả chỉ ra rằng cao chiết thân cây mật gấu giàu polyphenol và flavonoid, cho hiệu quả kháng enzyme α-amylase và α-glucosidase *in vitro* mạnh hơn cao chiết lá. Đồng thời, hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase ở ruột non chuột của cao chiết thân mật gấu cho hiệu quả với IC₅₀=23,02±0,21 µg/mL, chỉ thấp hơn 6 lần so với chất chuẩn acarbose (IC₅₀=3,78 ±0,47 µg/mL).

Các kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết thân cây mật gấu có thể là dược liệu tiềm năng trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến ĐTĐ, cần được nghiên cứu thêm về khả năng điều trị ĐTĐ trên mô hình bệnh ĐTĐ ở động vật *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài. Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: T2023-20.

α-glucosidase and pancreatic α-amylase. *International journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3387–3396.

- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Abdul, M.S.K., & Olalere, O.A. (2017). Phytochemical and pharmacological properties of *Vernonia amygdalina*: A review. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*, 2(1), 80–96.
- Ali, M., Diso, S. U., Waiya, S. A., & Abdallah, M. S. (2019). Phytochemical screening and antibacterial activity of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*). *Ann. Microbiol. Infect. Dis.* 2(4), 01–07.
- Bag, G.C., Devi, P.G., & Bhaigyabati, T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three Hedychium species of Manipur Valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154–159.
- Bộ Y Tế. (2009). *Dược điển Việt Nam IV (PL110-221)*. Nhà xuất bản Y học.
- Bộ Y Tế. (2018). *Dược điển Việt Nam V (PL13-PL14)*. Nhà xuất bản Y học.
- Eyong, E. U., Agiang, M. A., Atangwho, I. J., Iwara, I. A., Odey, M. O., & Ebong, P. E (2011). Phytochemicals and micronutrients composition of root and stem bark extracts of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicine and Medical Science*, 2(6), 900–903.
- Gu, C., Zhang, H., Putri, C. Y., & Ng, K. (2015). Evaluation of α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of flavonoids. *International Journal of Food and Nutritional Science*, 2(6), 1–6.
- Ijeh, I. I., & Ejike, C. E. C. C. (2011). Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Medicinal plants Research*, 5(7), 1051–1061.
- Inusa, A., Sanusi, S. B., Linatoc, A. C., Mainassara, M. M., & Awawu, J. J. (2018). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) collected from Lapai, Niger State, Nigeria on some selected pathogenic microorganisms. *Sci. World J.* 13(3), 15–18.
- Inzucchi, S.E. (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *The Journal of the American Medical Association*, 287(3), 360–372.
- Ismail-Beigi, F., Craven, T., Banerji, M.A., Basile, J., Calles, J., Cohen, R.M., Cuddihy, R., Cushman, W.C., Genuth, S., Grimm, R.H. & Hamilton, B.P. (2010). Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *The Lancet*, 376(9739), 419–430.
- Javed, A., Kamran, J.N., Showkat, R.M., Mohd, A., & Mohd, S. (2011). Review on role of natural α -glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. *International Journal of Biomedical Research*. *International Journal of Biomedical Research*, 2(6), 374–380.
- Kang, B.H., Racicot, K., Pilkenton, S.I., & Aporroldis E. (2014). Evaluation of the *in vitro* anti-hyperglycemic effect of *Cinnamomum cassia* derived phenolic phytochemicals, via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 155–160.
- Kaur, D., Kaur, N., & Chopra, A. (2019). A comprehensive review on phytochemistry and pharmacological activities of *Vernonia amygdalina*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2629–2636.
- Khan, R.M.M., Chua, Z.J.Y., Tan, J.C., Yang, Y., Liao, Z., & Zhao, Y. (2019). From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research. *Medicina*, 55(9), 546.
- Kim, J.S., Kwon, C.S., & Sou, K.H. (2000). Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosce Biotechnol Biochemistry*, 64(11), 2458–2461.
- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2008). Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *Journal of Food Biochemistry*, 32(1), 15–31.
- Malunga, L.N., & Eck, P. (2016). Inhibition of intestinal α -glucosidase and glucose absorption by feruloylated arabinoxylan mono- and oligosaccharides from corn bran and wheat aleurone. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016(1), 1–9.
- Michael, U. A., David, B. U., Theophine, C. O., Philip, F. U., Ogochukwu, A. M., & Benson, V. A. (2010). Antidiabetic effect of combined aqueous leaf extract of *Vernonia amygdalina* and metformin in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1(3), 197.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426–428.
- Phụng, N.K.P. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Tp. HCM.
- Patel, A., MacMahon, S., Chalmers, J., Neal, B., Billot, L., Woodward, M., Marre, M., Cooper, M., Glasziou, P., Grobbee, D., Hamet, P., Harrap, S., Heller, S., Liu, L., Mancia, G., Mogensen, C.E., Pan, C., Poulter, N., Rodgers, A., Williams, B., Bompoint, S., de Galan, B.E., Joshi, R., & Travert, F. (2008). Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 358(24), 2560–2572.
- Hộ, P.H. (1999 – 2000). *Cây cỏ Việt Nam. Quyển I, II và III*. NXB Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D. (2012). α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds

- from plant source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 141–183.
- Shai, L.J., Magano, S.R., Lebelo, S.L., Mogale, A.M. (2010). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2863–2867.
- Shashank, K., & Abhay, K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 4(2), 32–48.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 299, 152-178.
- Swamy, J., Prabhakar, G., Rasingam, L., & Kamalakar, P. (2015). *Gymnanthemum amygdalinum* (Asteraceae)-A New Addition to the Flora of Peninsular India. *International Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 4(7), 449–451.
- Tadera, K., Minami, Y., Takanatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 99–103.
- Toyang, N.J., & Verpoorte, R. (2013). A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3), 681–723.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93.
- Uzma, S., Khalid, M.K., Sridevi, C., Muhammad, T., Abdul, W., Shantini, V., Mehreen, G., & Shahnaz, P. (2017). New hybrid hydrazinyl thiazole substituted chromones: as potential α -amylase inhibitors and radical (DPPH & ABTS) scavengers. *Scientific Reports* volume. 7(1), 16980.
- Williams, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 48–57.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R. & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in Food and their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 59(3), 113–122.
- Zhenhua, Y., Wei, Z., Fajin, F., Yong, Z., & Wenyi, K. (2014). α -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 136-174.