



SÀNG LỌC PHÂN ĐOẠN TẢO NÂU *Dictyopteris polypodioides* CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α -AMYLASE VÀ α -GLUCOSIDASE

Trương Thị Phương Thảo*, Đái Thị Xuân Trang, Trần Thanh Mến và Trần Chí Linh

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

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Phương Thảo (email: truongthiphuongthao@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The use of α -glucosidase inhibitors is considered to be an effective strategy in the treatment of diabetes. 90% MeOH extract of *Dictyopteris polypodioides* exhibited the strongest α -amylase and α -glucosidase inhibitory with IC_{50} ($52.95 \pm 0.28 \text{ mgL}^{-1}$, $88.04 \pm 0.05 \text{ mgL}^{-1}$), respectively, non-different with Acarbose ($60.88 \pm 0.48 \text{ mgL}^{-1}$, $92.16 \pm 1.67 \text{ mgL}^{-1}$). Using a silica chromatography column, collecting Fr.2 with potential inhibitory. At a concentration of 0.1 mg/mL, Fr.2 showed remarkable inhibitory of α -amylase and α -glucosidase up to 87.49% và 93.43%, respectively. Fr.2 was constitutively fractionated by the ODS column, separated into Fr.2.1, Fr.2.2, and Fr.2.3. The result illustrated that Fr.2.2 showed excellent inhibitory activity against α -amylase ($IC_{50} = 26.14 \text{ mgL}^{-1}$) and α -glucosidase ($IC_{50} = 21.38 \text{ mgL}^{-1}$), significantly higher 3 and 4 times than Acarbose. Analysis of the possible compound in Fr.2.2 by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$, the chemical structure was elucidated as zonarol compound. Therefore, this study suggested that zonarol is the main contribution in Brown algae *Dictyopteris polypodioides* to controlling glucose postprandial in diabetes patients.

TÓM TẮT

Sử dụng hoạt chất tự nhiên có khả năng ức chế enzyme chuyển hóa carbohydrate như α -amylase và α -glucosidase, là một trong những liệu pháp hiệu quả trong điều trị bệnh đái tháo đường (ĐTĐ). Cao chiết 90% MeOH của Tảo nâu *Dictyopteris polypodioides* cho hiệu quả ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase cao nhất với giá trị IC_{50} lần lượt là ($52,95 \pm 0,28 \text{ mg L}^{-1}$, $88,04 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$), tương đương chất chuẩn Acarbose ($60,88 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$, $92,16 \pm 1,67 \text{ mg L}^{-1}$). Cao chiết 90% MeOH được tách bằng sắc ký cột silica gel thu được Fr.2 với hiệu quả ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase tốt nhất (87,49% và 93,43%) ở mức nồng độ 0,1 mg/mL. Nghiên cứu đã sàng lọc được phân đoạn Fr.2.2 (phân tách từ Fr.2 bởi sắc ký cột ODS) cho hiệu quả ức chế enzyme α -amylase ($IC_{50} = 26,14 \text{ mg L}^{-1}$) và α -glucosidase ($IC_{50} = 21,38 \text{ mg L}^{-1}$) tối ưu nhất, cao hơn 3 và 4 lần tương ứng so với chất chuẩn Acarbose. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ đã xác định được cấu trúc hợp chất zonarol trong phân đoạn Fr.2.2. Kết quả nghiên cứu chứng minh hợp chất zonarol là nhóm chất có tiềm năng cao ở Tảo nâu trong kiểm soát tăng glucose huyết ở người bệnh ĐTĐ.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 27/04/2022

Ngày nhận bài sửa: 13/05/2022

Ngày duyệt đăng: 17/05/2022

Title:

Screening α -amylase and α -glucosidase inhibitors of brown algae *Dictyopteris polypodioides*

Từ khóa:

Hạ glucose huyết, Tảo nâu *Dictyopteris polypodioides*, α -amylase, α -glucosidase

Keywords:

Anti-hyperglycemic, Brown alge *Dictyopteris polypodioides*, α -amylase, α -glucosidase

1. GIỚI THIỆU

Bệnh đái tháo đường (ĐTĐ) đang có xu hướng gia tăng rất mạnh trên toàn cầu. ĐTĐ là một bệnh rối loạn chuyển hóa đặc trưng bởi glucose huyết tăng cao, làm gián đoạn chuyển hóa carbohydrate, protein và chất béo, insulin không gây được đáp ứng một cách có hiệu quả (Khan et al., 2019). ĐTĐ có thể dẫn đến tổn thương lâu dài, rối loạn chức năng và suy các cơ quan khác nhau, như là mắt, thận, dây thần kinh, tim và mạch máu. ĐTĐ liên quan chặt chẽ đến rối loạn lipid máu, do đó bệnh nhân ĐTĐ dễ bị tăng cholesterol máu và tăng triglyceride máu (Attanayake et al., 2018). Một trong những nguyên nhân chính yếu gây ra bệnh ĐTĐ và các biến chứng liên quan có nguồn gốc từ sự gia tăng quá mức lượng glucose huyết sau khi ăn. Một trong những cách thức để kiểm soát glucose huyết sau khi ăn là ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase (Bhandari, 2008). Alpha-amylase có tác dụng thủy phân tinh bột thành disaccharide và oligosaccharide, trong khi α -glucosidase phân hủy disaccharide thành glucose (Thilagam et al., 2013). Các thuốc tổng hợp như Acarbose và Miglitol có khả năng ức chế rất mạnh α -amylase và α -glucosidase nhưng có nhiều tác dụng phụ như đầy hơi, nôn và tiêu chảy (Rupasinghe, 2016). Vì vậy, hiện nay, xu hướng nghiên cứu về ĐTĐ là tìm ra các hoạt chất ức chế α -amylase và α -glucosidase từ các nguyên liệu tự nhiên để sử dụng như các hợp chất chống ĐTĐ, chẳng hạn như triterpene glycoside từ lá cây Ngũ gia gai *Acanthopanax senticosus* Harm (Wang et al., 2012), flavonoid glycosides từ lá Cây Cò ke *Microcos paniculata* L. (Chen et al., 2013) và polyphenol từ trà xanh (Gao et al., 2013).

Tảo nâu *Dictyopterus polypodioides* (*D. polypodioides*) là một trong những cây dược liệu thuộc họ *Dictyopteris*, phân bố rộng rãi ở các vùng biển nhiệt đới, cận nhiệt đới Châu Á. Kết quả nghiên cứu của Kolsi et al. (2017) đã cho thấy cao chiết methanol (MeOH) Tảo nâu *D. polypodioides* có hiệu quả ức chế enzyme α -amylase rất cao lên đến 86,34% ở nồng độ 200 μ g/mL. Gần đây, zonarol, sesquiterpene hydroquinone, được phân lập từ chiết xuất methanol của họ *Dictyopteris*, đã được công bố có hiệu quả sinh học đáng kể như ức chế phospholipase (Mayer et al., 1993), chống oxy hóa (Lee et al., 2013), chống viêm (Yamada et al., 2014), kháng khuẩn (Akremi et al., 2017) và kháng nấm (Vicente et al., 2021). Vì vậy, khả năng sàng lọc được các hoạt chất tự nhiên có hoạt tính sinh học ở Tảo nâu *D. polypodioides* là rất lớn. Đặc biệt cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về khả năng hỗ trợ điều

trị bệnh ĐTĐ của loài dược liệu này. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá và sàng lọc các phân đoạn Tảo nâu có hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase tối ưu nhất, qua đó bước đầu xác định được hợp chất tự nhiên có hoạt tính ức chế mạnh nhằm hướng tới khả năng phân lập và sử dụng hợp chất có hoạt tính trong điều trị bệnh ĐTĐ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Vật liệu: Tảo nâu *D. polypodioides* được thu tại Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa vào tháng 03 năm 2021 (Hình 1). Mẫu cây được định danh 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, 500 μ L, 1000 μ L (Thermol LabSystems), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Japan), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức), sắc ký cột (Sigma), TSKgel® Octadecyl C18 (sắc ký cột ODS) (Sigma), máy phổ NMR 600 Mhz (Bruker, Đức), và một số thiết bị khác.

Hóa chất: methanol (Merck), n-hexane (Merck), ethyl acetate (EtOAc) (Merck), enzyme α -amylase từ tụy heo (Sigma), enzyme α -glucosidase (Sigma), acarbose (Sigma), Chloroform-d ($CDCl_3$) (Sigma), silica gel (Sigma).



Hình 1. Tảo nâu *D. polypodioides*

2.2 Phương pháp

2.2.1. Điều chế cao methanol tổng

Tảo nâu sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu (150 g) được cho vào trong túi vải và ngâm dầm trong methanol (3L) khoảng 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Mẫu được ngâm 3 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô đuổi dung môi thu được cao methanol tổng (MeOH) của tảo nâu và được bảo quản sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Quy trình chiết cao phân đoạn Tảo nâu dựa theo đánh giá hoạt tính ức chế enzyme

Cao methanol tổng được chiết lỏng lỏng với ethyl acetate:H₂O (1:1, v:v) thu được cao chiết ethyl acetate (EtOAc) và cao nước. Tiếp đến, cao EtOAc được chiết lỏng lỏng với 90% MeOH:Hexane (1:1, v:v) thu được cao 90% MeOH và cao hexane. Một lượng nhỏ 4 mẫu cao chiết trên được hòa tan trong 50% dimethyl sulfoxide (DMSO) và tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase. Cao chiết 90% MeOH có hoạt tính ức chế enzyme mạnh sẽ được tách phân đoạn bằng sắc ký cột silica gel CC (5 x 20 cm, 0,1 kg) với hệ dung môi EtOAc:Hexane với tỉ lệ lần lượt là 1:9, 1:5, 1:3, thu được 3 cao chiết tương ứng ký hiệu là Fr.1, Fr.2 và Fr.3. Trong 3 phân đoạn (Fr.1, Fr.2, Fr.3), phân đoạn Fr.2 cho kết quả ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase hiệu quả nhất sẽ được phân tách thành các phân đoạn nhỏ và sàng lọc hoạt tính. Fr.2 được tách hợp chất bằng sắc ký cột ODS CC (5 x 20 cm, 0,1 kg) với hệ dung môi MeOH có độ phân cực tăng dần là 60%, 80% và 90%, thu được Fr.2.1, Fr.2.2 và Fr.2.3. Phân đoạn Fr.2.2 cho kết quả ức chế enzyme tối ưu nhất với giá trị IC₅₀ nhỏ nhất, được phân lập và xác định cấu trúc hóa học của hợp chất bằng phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR.

2.2.3. Phương pháp khảo sát ức chế enzyme α -amylase

Khả năng ức chế sự thủy phân tinh bột của các mẫu thử được thực hiện theo phương pháp của Trang và ctv. (2012) có điều chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 50 μ L dung dịch đệm phosphate (pH=7) với 50 μ L dung dịch mẫu thử và 50 μ L enzyme α -amylase (3U) được đem ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 phút. Sau đó, 50 μ L tinh bột (2 mg/mL) được cho vào hỗn hợp trên và tiếp tục ủ 37°C trong 15 phút. Tiếp theo, 200 μ L dung dịch HCl đậm đặc được thêm vào để ngừng phản ứng. Cuối cùng, 300 μ L

dung dịch thuốc thử iod 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 được sử dụng như đối chứng dương.

Phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế (%) = $100 - ((A_0 - A_1) / A_0 \times 100)$.

Với A₀: Giá trị mật độ quang của dung dịch đối chứng. A₁: Giá trị mật độ quang của dung dịch sau phản ứng.

2.2.4. Phương pháp khảo sát ức chế enzyme α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các mẫu thử 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 (1U) và 40 μ L cao chiết. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, 40 μ L p-nitro-phenyl- 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 của p-nitrophenol giải phóng được đo tại bước sóng 405 nm. Acarbose được sử dụng như đối chứng dương.

2.2.5. Thống kê phân tích số liệu

Các thử nghiệm được lập lại ba lần và kết quả thu được được biểu thị bằng trung bình \pm sai số. Các kết quả được phân tích bằng phần mềm Minitab 16.0 (ANOVA (one-way) và thử nghiệm Turkey).

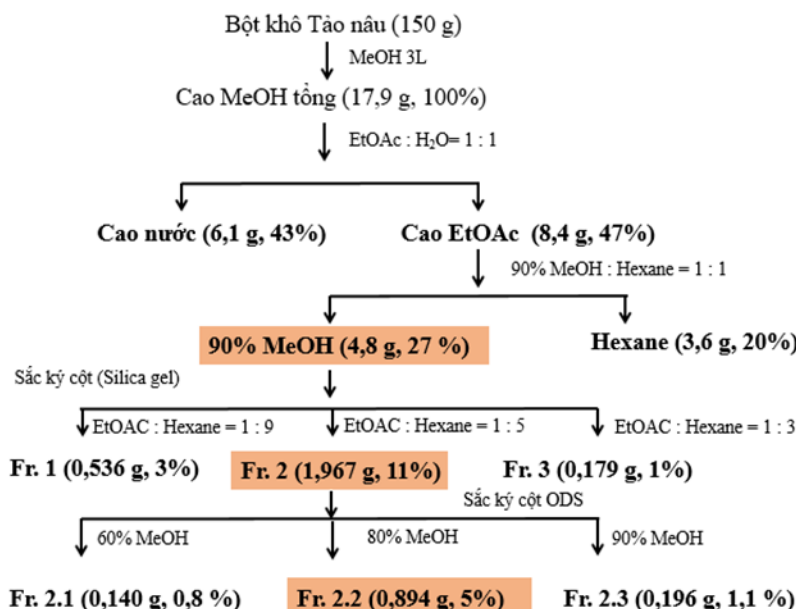
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sàng lọc cao chiết Tảo nâu có hoạt tính ức chế enzyme α -Amylase và α -Glucosidase

Mẫu Tảo nâu sau sấy (150 g) được nghiền thành bột khô và chiết với methanol thu được cao tổng methanol (17,9 g, 100%). Cao chiết methanol tổng của Tảo nâu được chiết với ethyl acetate: H₂O (1:1, v:v) thu được cao ethyl acetate (8,4 g, 47%) và cao nước (6,1 g, 43%). Cao ethyl acetate được tiếp tục chiết với dung môi 90% MeOH: Hexane (1:1, v:v) thu được cao 90% MeOH (4,8 g, 27%), và cao hexane (3,6 g, 20%). Tất cả 4 loại cao chiết thu được sẽ được khảo sát khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme của 4 cao phân đoạn theo thứ tự như sau: cao 90% MeOH > Acarbose (chất chuẩn) > ethyl acetate > cao nước > cao hexane. Trong 4 cao phân đoạn, kết quả nghiên cứu cho thấy cao 90% MeOH cho hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -

glucosidase mạnh nhất ($IC_{50}=52,95 \pm 0,28 \text{ mg l}^{-1}$ và $IC_{50} = 88,04 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$), tương đương so với chất chuẩn Acarbose ($IC_{50}=60,88 \pm 0,48 \text{ mg l}^{-1}$ và $IC_{50} = 92,16 \pm 1,67 \text{ mg l}^{-1}$) ($P<0,05$) (Bảng 1). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với công bố trước đó của Kolsi et al. (2017), dịch chiết MeOH Tảo nâu *D. polydoides* cho hiệu quả ức chế enzyme α -amylase cao nhất so với các dung môi như ethyl acetate, hexane (phần trăm ức chế 86,34% ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$). Các hoạt chất từ thực vật có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase có thể được sử dụng như một nhóm thuốc hỗ trợ điều trị

bệnh ĐTĐ bằng cách ngăn chặn sự thủy phân nhanh các dạng carbohydrate thành đường đơn và do đó kiểm soát lượng glucose huyết (Zhenhua et al., 2014). Kết quả nghiên cứu cho thấy cao 90% MeOH có thể chứa những hợp chất có hoạt tính gây ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase hiệu quả hơn so với chất thương mại. Vì vậy, mục tiêu kế tiếp của nghiên cứu là tiến hành phân tách dịch chiết 90% MeOH thành các cao phân đoạn bằng sắc ký cột với gel silica và ODS nhằm xác định được hợp chất chính có hoạt tính gây ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase mạnh nhất (Hình 2).



Hình 2. Quy trình sàng lọc cao phân đoạn Tảo nâu dựa theo hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase

Bảng 1. Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các cao chiết Tảo nâu

Cao chiết và chất chuẩn	Giá trị IC_{50} (mg L^{-1})	
	Enzyme α -amylase	Enzyme α -glucosidase
Hexane	2574,45 ^a \pm 5,08	1976,32 ^a \pm 17,83
Cao nước	1584,21 ^b \pm 13,47	1135,81 ^b \pm 11,91
Ethyl acetate	1119,19 ^c \pm 8,60	770,25 ^c \pm 11,19
90% MeOH	52,95 ^d \pm 0,28	88,04 ^d \pm 0,05
Acarbose	60,88 ^d \pm 0,48	92,16 ^d \pm 1,67

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%, Turkey-test.

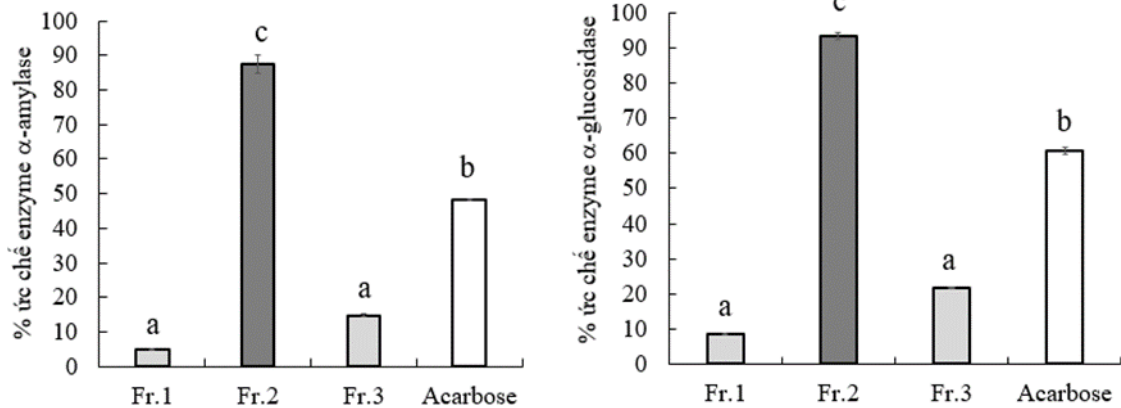
3.2 Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các phân đoạn từ cao chiết 90% MeOH Tảo nâu

Ba phân đoạn cao từ cao chiết 90% MeOH được phân tách và thu bằng phương pháp sắc ký cột silica

gel (5 x 20 cm, 0,1 kg) ký hiệu lần lượt là Fr.1 (0,536 g, 3%), Fr.2 (1,967 g, 11%) và Fr.3 (0,179 g, 1%). Kết quả khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của 3 phân đoạn ở mức nồng độ đánh giá 0,1 mg/mL được trình bày ở Hình 3. Kết

qua đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của 3 phân đoạn cho thấy Fr.2 có hoạt tính mạnh hơn so với chất chuẩn Acarbose với khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$). Ngược lại, Fr.1 và Fr.3 thể hiện hoạt tính ức chế enzyme yếu hơn so với chất chuẩn. Phần trăm gây ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của Fr.2 lần lượt là

87,49% \pm 2,72 ($IC_{50} = 38,09 \pm 1,36 \text{ mg L}^{-1}$) và 93,43% \pm 1,02 ($IC_{50} = 26,75 \pm 2,11 \text{ mg L}^{-1}$). Đặc biệt, phân đoạn Fr.2 cho hiệu quả ức chế enzyme mạnh hơn cao chiết 90% MeOH. Phân đoạn Fr.2 có thể chứa hợp chất chính gây ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase, hiệu quả hơn so với chất chuẩn cần được tiếp tục sàng lọc ở bước tiếp theo.



Hình 3. Phần trăm gây ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của 3 phân đoạn (Fr.1, Fr.2, Fr.3) từ cao chiết 90% MeOH Tảo nâu

Ghi chú: giá trị phần trăm gây ức chế ở từng phân đoạn với các mẫu tự khác nhau đại diện cho sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

3.3 Sàng lọc hợp chất có hoạt tính gây ức chế enzyme tối ưu nhất từ phân đoạn Fr.2

Phân đoạn Fr.2 được tiến hành phân tách qua sắc ký cột ODS với dung môi MeOH 60%, 80% và 90% lần lượt thu được 3 phân đoạn gồm Fr.2.1 (0,140 g), Fr.2.2 (0,894 g) và Fr.2.3 (0,196 g). Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của phân đoạn Fr.2.1, Fr.2.2 và Fr.2.3 được trình bày trong Bảng 2. Phân đoạn Fr.2.2 cho kết quả ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase tối ưu nhất với phần trăm ức chế lần lượt là 94,96% và 99,63%, ở mức nồng độ 50 mg L⁻¹. Giá trị IC_{50} của Fr.2.2 thấp hơn đáng kể so với chất chuẩn với khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Qua kết quả của nghiên cứu, Fr.2.2 được chứng minh có hiệu quả ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase tối ưu nhất trong tất cả các loại cao phân đoạn. Điều này có thể được giải thích bởi sự hiện diện của nhóm chất mang hoạt tính sinh học mạnh trong phân đoạn Fr.2.2. Vì vậy, phân đoạn Fr.2.2 đã được phân tích cấu trúc bằng ¹H-NMR và ¹³C-NMR, kết quả phổ được trình bày trong Hình 4. Hợp chất

chính chứa trong phân đoạn Fr.2.2 được xác định cấu trúc là hợp chất zonarol (Hình 5).

Zonarol là một hợp chất có cấu trúc vòng para-hydroquinone, được phân lập và chiết xuất từ dung môi methanol của họ Tảo nâu *Dictyopteris* và xác định rõ cấu trúc hóa học lần đầu tiên năm 1986 (Fenical et al., 1973; Mori & Komatsu, 1986). Một số tác dụng dược lý của hợp chất zonarol đã được công bố như hiệu quả kháng nấm, kháng khuẩn, kháng oxy hóa (Lee et al., 2013; Yamada et al., 2014; Akremi et al., 2017; Vicente et al., 2021). Kết quả nghiên cứu của Yamada et al. (2014) cho thấy zonarol biểu hiện hoạt tính kháng viêm mạnh trên mô hình chuột được gây viêm ruột bằng dextran sulfate sodium (DSS) với hiệu quả tương đương với chất chuẩn 5-aminosalicylic acid (5-ASA). Điều trị bằng zonarol làm giảm đáng kể sự biểu hiện của các phân tử tín hiệu gây viêm và tiền viêm (TNF- α và IL-6) và ngăn chặn quá trình apoptosis của các tế bào biểu mô ruột. Đồng thời, zonarol có tác dụng bảo vệ tế bào chống lại sự viêm gây ra bởi lipopolysaccharide (LPS) đối với dòng tế bào đại thực bào chuột RAW264.7 *in vitro*. Ngoài ra, Shimizu et al. (2015) đã công bố zonarol, (hợp chất có cấu trúc para-hydroquinone) thuộc nhóm chất có

ái lực điện tử (electrophilic) làm kích hoạt Nrf2/ARE, dẫn đến sự gia tăng biểu hiện của các enzyme kháng oxy hóa (Phase II enzyme) như NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase, heme oxygenase-1 (HO-1), và peroxiredoxin 4 (PRDX4). Những hợp chất có đặc tính electrophilic tác động đến sự cân bằng chỉ số oxy hóa nội bào, đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả bảo vệ tế bào (Talalay, 2000; Itoh et al., 2004). Isozonarol (hợp chất có cấu trúc vòng para-hydroquinone tương tự zonarol) cho hiệu quả ức chế gốc tự do DPPH với giá trị EC₅₀ (71 μM) cao hơn chất chuẩn α-tocopherol (EC₅₀=74 μM). Hợp chất có cấu trúc vòng para-hydroquinone có vai trò quan trọng trong hiệu quả trung hòa các gốc tự do. Kết quả nghiên cứu của Kumagai et al. (2018) đã cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa thấp ở những hợp chất không có cấu trúc para-hydroquinone.

Stress oxy hóa và viêm là những nguyên nhân chính gây ra bệnh ĐTĐ. Stress oxy hóa dẫn đến sự gia tăng mức đường huyết trong máu thông qua nhiều cách thức khác nhau. Lượng glucose dư thừa cũng gây ra sự gia tăng hoạt động của protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), ảnh hưởng đến con đường điều hòa insulin. Các quá trình này có liên quan đến sự thay đổi trạng thái oxy hóa khử gây ra bệnh ĐTĐ type 2 và các biến chứng của nó (Jung et al., 2014). Có nhiều mối liên quan giữa mức độ tăng của các dấu hiệu viêm giai đoạn cấp tính với các chỉ số kháng insulin và sự tiến triển bệnh ĐTĐ type 2 (Greenfield & Campbell, 2006; Luft et al., 2013). Vì vậy, các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm mạnh sẽ có tiềm năng lớn trong việc kiểm soát các biến chứng của bệnh ĐTĐ. Kết

quả của nghiên cứu này đã sàng lọc được phân đoạn Fr.2.2 của Tảo nâu có hiệu quả tốt nhất trong ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase, cũng như bước đầu xác định được hợp chất zonarol có trong phân đoạn Fr.2.2. Hoạt tính ức chế enzyme chuyển hóa carbohydrate của zonarol có thể có mối liên hệ về mặt cấu trúc hóa học dạng vòng para-hydroquinone như các công bố trước đó về khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm mạnh.

Những nghiên cứu kế tiếp cần được xem xét ở khả năng phân lập và tinh sạch hợp chất zonarol từ Tảo nâu, thử hoạt tính hạ glucose huyết của hợp chất zonarol từ mức độ *in vitro* đến *in vivo*, nhằm hướng đến tiềm năng ứng dụng zonarol trong hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ.

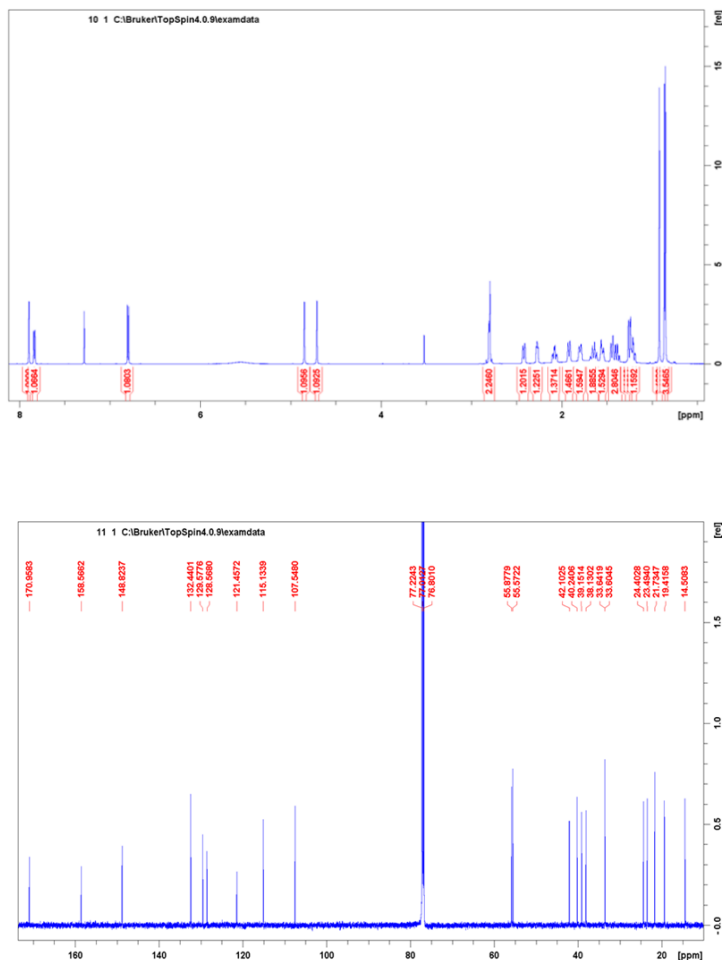
3.4 Dữ liệu phổ của hợp chất Zonarol

Zonarol: C₂₁H₃₀O₂; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 0,74 (3H, s, H-15), 0,79 (3H, s, H-14), 0,85 (3H, s, H-13), 1,97 (1H, m, H-9), 2,34 (1H, m, H-7), 2,56 (2H, m, H-11), 4,29 (1H, bs, H-12), 4,75 (1H, bs, H-12), 6,43 (1H, m, H-6'), 6,63 (1H, dd, J= 9,9/2,4 Hz, H-4') và 6,72 (1H, d, J=9,9 Hz, H-3'); ¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): 39.15 (C-1), 19.41 (C-2), 42.10 (C-3), 33.64 (C-4), 55.57 (C-5), 24.40 (C-6), 38.13 (C-7), 148.82 (C-8), 55.87 (C-9), 40.24 (C-10), 23.49 (C-11), 107.54 (C-12), 21.73 (C-13), 33.60 (C-14), 14.50 (C-15), 128.56 (C-1'), 121.45 (C-2'), 115.13 (C-3'), 129.57 (C-4'), 158.56 (C-5'), 132.44 (C-6') (Hình 4). So sánh kết quả phổ của hợp chất trong phân đoạn Fr.2.2 tương đồng với dữ liệu phổ của cấu trúc zonarol phân lập từ một loài Tảo nâu khác (*D. zonarioides*) thuộc họ *Dictyopteris* theo nghiên cứu đã công bố của Fenical et al. (1973).

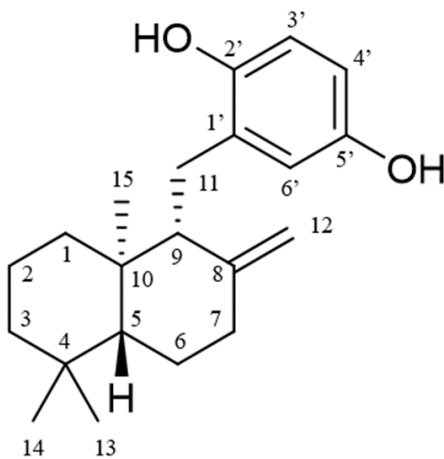
Bảng 2. Hoạt tính ức chế enzyme α-amylase^a và α-glucosidase^b của phân đoạn Fr.2.1, Fr.2.2 và Fr.2.3

Phân đoạn	Nồng độ (mg/L)	% Ức chế tối đa		Giá trị IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	
		Enzyme α-amylase	Enzyme α-glucosidase	Enzyme α-amylase	Enzyme α-glucosidase
Fr.2.1	1500	18,36	26,85	2001,36	1868,95
Fr.2.2	50	94,96	99,63	26,14	21,38
Fr.2.3	1500	25,68	38,94	1754,45	1458,95
Acarbose	50	44,43	36,78	77,47	84,88

^{a,b} Giá trị trung bình với 3 lần lặp lại của các phân đoạn.



Hình 4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ xác định cấu trúc của hợp chất zonarol trong phân đoạn Fr.2.2



Hình 5. Cấu trúc hóa học của hợp chất zonarol

4. KẾT LUẬN

Kết quả sàng lọc phân đoạn Tảo nâu dựa theo hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase cho hiệu quả ức chế lần lượt theo thứ tự như sau: 90% MeOH < Fr.2 < Fr.2.2. Giá trị IC_{50} nhỏ nhất chứng minh cho hiệu quả ức chế enzyme mạnh, chi tiết như sau: 90% MeOH ($IC_{50}=52,95\pm 0,28$ mg L⁻¹ và $IC_{50}=88,04\pm 0,05$ mg L⁻¹), phân đoạn Fr.2 ($IC_{50}=38,09\pm 1,36$ mg L⁻¹ và $IC_{50}=26,75\pm 2,11$ mg L⁻¹) và Fr.2.2 ($IC_{50}=26,14\pm 0,18$ mg L⁻¹ và $IC_{50}=21,38\pm 0,11$ mg L⁻¹). Trong đó, Fr.2.2 cho hiệu quả ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase cao gấp 3 và 4 lần tương ứng so với chất chuẩn Acarbose. Cấu trúc

hóa học của hợp chất chính trong phân đoạn Fr.2.2 được xác định là zonarol bằng phương pháp ¹H-NMR và ¹³C-NMR.

Các kết quả nghiên cứu cho thấy, zonarol là hợp chất tiềm năng trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan bệnh ĐTĐ, cần được nghiên cứu thêm để xem xét khả năng ứng dụng trong y học hoặc trong thực phẩm chức năng.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: T2022-34.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akreml, N., Cappoen, D., Anthonissen, R., Verschaeve, L., & Bouraoui, A. (2017). Phytochemical and in vitro antimicrobial and genotoxic activity in the brown algae *Dictyopteris membranacea*. *South African Journal of Botany*, 108, 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.08.009>
- Amaral, S., Mira, L., Nogueira, J. M. F., da Silva, A. P., & Florêncio, M. H. (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties - A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(5), 1876-1883. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.045>
- Bhandari, M. R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., & Kawabata, J. (2008). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of nepalese medicinal herb pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chem*, 106(1), 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.077>
- Chen, Y. G., Li, P., Li, P., Yan, R., Zhang, X. Q., Wang, Y., Zhang, X. T., Ye, W. C., & Zhang, Q. W. (2013). α -Glucosidase Inhibitory Effect and Simultaneous Quantification of Three Major Flavonoid Glycosides in *Microctis folium*. *Molecules*, 18(4), 4221-4232. <https://doi.org/10.3390/molecules18044221>
- Fenical, W., Sims, J. J., Squatrito, D., Wing, R. M., & Radlick, P. (1973). Marine natural products. VII. Zonarol and isozonarol, fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*. *The Journal of Organic Chemistry*, 38(13), 2383-2386. <https://doi.org/10.1021/jo00953a022>
- Gao, J., Xu, P., Wang, Y., Wang, Y., & Hochstetter, D. (2013). 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*, 18(9), 11614-11623. <https://doi.org/10.3390/molecules180911614>
- Greenfield J. R., & Campbell L. V. (2006). Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: cause or effect? *Curr Diabetes Rev*, 2, 195-211. 10.2174/157339906776818532
- Itoh K., Tong K. I., & Yamamoto M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med*, 36, 1208-1213. 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.075
- Hộ, P. H. (1999). *Cây cỏ Việt Nam, Quyển I*. Nhà xuất bản Trẻ Hà Nội.
- Jung, H. A., Karki, S., Ehom, N. Y., Yoon, M. H., Kim, E. J., & Choi, J. S. (2014). Anti-diabetic and anti-inflammatory effects of green and red kohlrabi cultivars (*Brassica oleracea* var. gongylodes). *Preventive nutrition and food science*, 19(4), 281. 10.3746/pnf.2014.19.4.281
- Kolsi, R. B. A., Frikha, D., Salah, H. B., Jribi, I., Patti, F. P., Allouche, N., & Belghith, K. (2017). Phenolic composition and biological activities of brown alga *Dictyopteris polypodioides*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 109-113.
- Kumagai, M., Nishikawa, K., Matsuura, H., Umezawa, T., Matsuda, F., & Okino, T. (2018). Antioxidants from the brown alga *Dictyopteris undulata*. *Molecules*, 23(5), p.1214. 10.3390/molecules23051214
- Lee, J. H., & Kim G. H. (2013). Evaluation of antioxidant activity of marine algae-extracts from Korea. *J Aquatic Food Product Technol*, 24(3), 227-240. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.770809>
- Luft, V. C., Schmidt, M. I., Pankow, J. S., Couper, D., Ballantyne, C. M., Young, J. H., & Duncan, B. B. (2013). Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study.

- Diabetol Metab Syndr*, 5, 31. 10.1186/1758-5996-5-31
- Mori, K., & Komatsu, M. (1986). Synthesis and Absolute Configuration of Zonarol. A Fungitoxic Hydroquinone from the Brown Seaweed *Dictyoptfris Zonarioides* (1). *Bulletin des Societes Chimiques Belges*, 95(9-10), 771-781. <https://doi.org/10.1002/bscb.19860950906>
- Rupasinghe, H. P. V., Sekhon-Loodu, S., Mantso, T., & Panayiotidis, M. I. (2016). Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacol Ther*, 165, 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.005>
- Shai, L. J., Magano, S. R., Lebelo, S. L., & Mogale, A. M. (2011). 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.
- Shimizu, H., Koyama, T., Yamada, S., Lipton, S. A., & Satoh, T. (2015). Zonarol, a sesquiterpene from the brown algae *Dictyopteris undulata*, provides neuroprotection by activating the Nrf2/ARE pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 457(4), 718-722. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.059>
- Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*, 12, 5-11. <https://doi.org/10.1002/biof.5520120102>
- Thilagam, E., Parimaladevi, B., Kumarappan, C., & Mandal, S. C. (2013). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 6(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.10.005>
- Trang, Đ. T. X., Anh, B. T., Mến, T. T., & Anh, P. T. L. (2012). Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá Ổi (*Psidium guajava* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22b, 163-171.
- Vicente, T. F., Lemos, M. F., Félix, R., Valentão, P., & Félix, C. (2021). Marine Macroalgae, a Source of Natural Inhibitors of Fungal Phytopathogens. *Journal of Fungi*, 7(12), 1006. <https://doi.org/10.3390/jof7121006>
- Wang, H., Du, Y. J., & Song, H. C. (2010). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food chemistry*, 123(1), 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.088>
- Wang, Z. B., Jiang, H., Xia, Y. G., Yang, B. Y., & Kuang, H. X. (2012). α -Glucosidase Inhibitory Constituents from *Acanthopanax senticosus* Harm Leaves. *Molecules*, 17(6), 6269-6276. <https://doi.org/10.3390/molecules17066269>
- Yamada, S., Koyama, T., Noguchi, H., Ueda, Y., Kitsuyama, R., Shimizu, H., Tanimoto, A., Wang, K. Y., Nawata, A., Nakayama, T., & Sasaguri, Y. (2014). Marine hydroquinone zonarol prevents inflammation and apoptosis in dextran sulfate sodium-induced mice ulcerative colitis. *PLoS one*, 9(11), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113509>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>