

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Hà Thị Bích Ngọc

**ĐIỀU TRA, NGHIÊN CỨU MỘT SỐ THỰC VẬT
VIỆT NAM CÓ TÁC DỤNG HỖ TRỢ ĐIỀU HÒA
LƯỢNG ĐƯỜNG TRONG MÁU ĐỂ ỨNG DỤNG CHO
BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 2**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2012

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Hà Thị Bích Ngọc

**ĐIỀU TRA, NGHIÊN CỨU MỘT SỐ THỰC VẬT
VIỆT NAM CÓ TÁC DỤNG HỖ TRỢ ĐIỀU HÒA
LƯỢNG ĐƯỜNG TRONG MÁU ĐỂ ỨNG DỤNG CHO
BỆNH NHÂN ĐÁI THÁO ĐƯỜNG TYPE 2**

Chuyên ngành : Hóa sinh học

Mã số : 62 42 30 15

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Nguyễn Văn Mùi**
- 2. TS. Phạm Thị Hồng Minh**

Hà Nội – 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Nghiên cứu sinh

Hà Thị Bích Ngọc

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài luận án này tôi xin được gửi lời biết ơn trân trọng nhất tới người Thầy của tôi, PGS.TS.Nguyễn Văn Mùi, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và ủng hộ tôi trong suốt thời gian qua. Kính chúc sức khỏe Thầy!

Cũng với lòng biết ơn chân thành, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS.Phạm Thị Hồng Minh, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, người đã dành cho tôi những điều kiện thuận lợi nhất để hoàn thành luận án.

Tôi xin cảm ơn tập thể các cán bộ Phòng Hoạt chất sinh học và Phòng Cấu trúc phân tử - Viện Hóa học đã giúp đỡ tôi về chuyên môn nghiên cứu.

Nhân đây cho tôi gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS.Nguyễn Xuân Phương, ThS.Nguyễn Thế Cường, TS.Trần Thế Bách – Phòng Thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên thực vật đã tận tình giúp đỡ.

Tôi xin được cảm ơn các thầy cô giáo, các anh chị em công tác tại Bộ môn Sinh lý thực vật và Hóa sinh, Bộ môn Tế bào-Mô phôi-Lý sinh học, Khoa Sinh học, Trường ĐH KHTN, PGS.TS.Bùi Phương Thuận, GS.TS.Nguyễn Quốc Khang, GS.TS.Đỗ Ngọc Liên, PGS.TS.Phan Tuấn Nghĩa, PGS.TS.Nguyễn Thị Quý, PGS.TS.Trần Ninh, TS.Nguyễn Quang Huy, ThS.Bùi Thị Vân Khánh ... đã luôn ủng hộ và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn đề tài KLEPT.09.03- Phòng thí nghiệm trọng điểm – ĐH KHTN đã tạo điều kiện về vật chất, thiết bị trong thời gian nghiên cứu luận án.

Nhân đây tôi cũng xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành nhất tới Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương, Viện Dinh dưỡng, Trung tâm chẩn đoán Y khoa VIPLAB, ... đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành những nghiên cứu của mình.

Một lời biết ơn chân thành từ đáy lòng mình, tôi xin được cảm ơn GS.TS.NGUYỄN Trần Hữu Nghị, TS.Trần Thị Mai cùng Ban lãnh đạo Trường ĐH Dân lập Hải Phòng, các đồng nghiệp đã luôn tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cả về mặt vật chất và tinh thần, luôn ủng hộ và động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Tôi xin được cảm ơn các bạn đã từng học tập và làm việc tại Phòng Nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính sinh học – Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sự sống – ĐH KHTN đã giúp đỡ và đồng hành cùng tôi trên những bước đường nghiên cứu.

Lời biết ơn cuối cùng tôi xin được dành cho cha mẹ và gia đình tôi, những người thân yêu, những người bạn, vì tôi biết rằng nếu không có họ tôi không thể có được ngày hôm nay.

Xin chân thành cảm ơn!

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

$^1\text{H-NMR}$:	$^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy}$ (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton)
$^{13}\text{C-NMR}$:	$^{13}\text{C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy}$ (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon)
ATP:	Adenosine triphosphate
BMI:	Body Mass Index (Chỉ số khối cơ thể)
CBuOH:	Cao n-butanol
CC:	Cao cồn
CEtA:	Cao ethylacetate
CHe:	Cao n-hexane
CNC:	Cao nước cuối
CNN:	Cao nước nóng
COSY :	Chemical Shift Correlation Spectroscopy
CTPT :	Công thức phân tử
DEPT:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ĐTĐ:	Đái tháo đường
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Kỹ thuật miễn dịch liên kết với enzym)
g:	Gam
G1P:	Glycerol 1 phosphate
GOD:	Glucose oxidase
GOT:	Glutamate oxalate transaminase
GPT:	Glutamate pyruvate transaminase
h:	Giờ
HbA _{1c} :	Glycated hemoglobin (Hemoglobin gắn đường glucose)
HDL:	High Density Lipoprotein (Lipoprotein tỷ trọng cao)
HFD:	High fat diet (Chế độ ăn giàu chất béo)
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC:	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
IC ₅₀ :	Half maximal inhibitory concentration (Nồng độ gây ức chế 50% hoạt tính sinh học hoặc hóa sinh)
IDF:	International Diabetes Federation (Liên đoàn Đái tháo đường Quốc tế)

LD ₀ :	Lethal dose, 0% (Liều dưới liều chết)
LD ₅₀ :	Lethal dose, 50% (Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm)
LDL:	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein tỷ trọng thấp)
m:	Khối lượng
mg:	Miligam
ml:	Mililit
Mp:	Melting point (Điểm nóng chảy)
MS:	Mass Spectroscopy (Phổ khối lượng)
NCEP:	National Cholesterol Education Program (Chương trình Giáo dục Quốc gia về Cholesterol)
ND:	Normal diet (Ăn chế độ ăn bình thường)
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân)
OD:	Optical Density (Mật độ quang)
POD:	Peroxidase
P-value:	Probability value (Trị số p)
PVPP:	Polyvinylpyrrolidone
R:	Receptor
R _f :	Hệ số di chuyển
R ² :	Hệ số tương quan
Ser:	Serine
STZ:	Streptozotocin
TV:	Thực vật
Tyr:	Tyrosine
Thr:	Threonine
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotein tỷ trọng rất thấp)
WHO:	World Health Organization - Tổ chức Y tế thế giới
μg:	Microgram
μl:	Microlit

DANH MỤC CÁC BẢNG

Tên bảng	Trang
Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh ĐTĐ	5
Bảng 1.2. Tiêu chuẩn đánh giá kết quả xét nghiệm của người bệnh ĐTĐ theo WHO-năm 2002	5
Bảng 1.3. Định nghĩa của NCEP về hội chứng trao đổi chất	10
Bảng 1.4. : Dịch chiết/hoạt chất chiết xuất từ thực vật có hoạt tính ức chế α -glucosidase	26
Bảng 2.1. Các mẫu thực vật được điều tra, nghiên cứu	35
Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu	37
Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm gây chuột ĐTĐ type 2	41
Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của 24 mẫu thực vật lên chuột nhất ĐTĐ type 2	44
Bảng 2.5. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu phân đoạn mẫu lá vối và lá chè đắng	45
Bảng 3.1. Chiết xuất các mẫu thực vật bằng nước nóng và cồn	57
Bảng 3.2. Sự khác biệt về các chỉ số mỡ máu giữa chuột ở nhóm ND và HFD	61
Bảng 3.3. Mật độ quang của insulin chuẩn	63
Bảng 3.4. Khả năng dung nạp glucose của các nhóm chuột	65
Bảng 3.5 . Phần trăm tách chiết thu cao phân đoạn lá vối	75
Bảng 3.6. Nồng độ đường huyết chuột ĐTĐ type 2 sau khi uống cao chiết phân đoạn lá vối	75
Bảng 3.7: Các số liệu phổ của 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon	80
Bảng 3.8. Độ dịch chuyển hóa học ^{13}C -NMR của chất C3	82
Bảng 3.9. Số liệu phổ cacbon của LVE2 (3 β -hydroxy-olean-12(13)-en- 28-oic acid) và phổ của oleanolic acid	85
Bảng 3.10. Phần trăm khối lượng của các chất tinh sạch từ lá vối	89
Bảng 3.11. Phần trăm tách chiết cao phân đoạn lá chè đắng	92
Bảng 3.12. Nồng độ đường huyết chuột ĐTĐ type 2 sau khi uống cao chiết	92

phân đoạn lá chè đắng	
Bảng 3.13. Các số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của H4	96
Bảng 3.14. Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 5 chất tinh sạch từ lá vối, lá chè đắng	97
Bảng 3.15. Kết quả định tính thành phần hóa học	101
Bảng 3.16. Thành phần chế phẩm Thivoda	104
Bảng 3.17. Bảng theo dõi chuột thí nghiệm LD ₅₀	110

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Tên hình	Trang
Hình 1.1. Cơ chế tác dụng của insulin	8
Hình 1.2. Cơ chế phân tử giải phóng insulin	9
Hình 1.3. Receptor của insulin và vùng tyrosine kinase	12
Hình 1.4. Thủy phân oligosaccharide(trái) - Cơ chế cạnh tranh của Acarbose (phải)	25
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	38
Hình 2.2. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn bằng các dung môi hữu cơ	40
Hình 2.3. Thử nghiệm hoạt tính ức chế α -glucosidase bởi Glucose Kit	48
Hình 2.4. Quy trình bào chế chế phẩm Thivoda	54
Hình 3.1. Sự thay đổi trọng lượng chuột sau 8 tuần nuôi	60
Hình 3.2. Chuột nuôi HFD (bên trái) và chuột nuôi ND (bên phải)	61
Hình 3.3. Nồng độ đường huyết của các lô chuột thí nghiệm tại các thời điểm	62
Hình 3.4. Xây dựng phương trình hồi qui tuyến tính	64
Hình 3.5. Định lượng nồng độ insulin máu chuột HFD + STZ	65
Hình 3.6. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt I	66
Hình 3.7. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt II	68
Hình 3.8. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt III	69
Hình 3.9. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt IV	70
Hình 3.10. Giá trị các chỉ số GOT, GPT trong máu chuột	72
Hình 3.11. Hình ảnh quan sát tiêu bản đúc cắt gan chuột	73
Hình 3.12. Tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn lá với	76
Hình 3.13. Cấu trúc hợp chất H1 (β -sitosterol)	78
Hình 3.14. Cấu trúc hợp chất H2 (β -sitosterol-glucopyranoside)	79

Hình 3.15. Chất H6 tinh sạch (A) và sắc ký đồ bản mỏng chất H6 (B)	80
Hình 3.16. Cấu trúc H6 (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon)	81
Hình 3.17. Chất tinh sạch (phải) và xác định cấu trúc C3 (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) (trái)	83
Hình 3.18. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc của LVE2 (3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid) (trái)	85
Hình 3.19. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc của LVE4 (2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid) (trái)	87
Hình 3.20. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc hóa học của quercetin (trái)	88
Hình 3.21. Nồng độ đường huyết chuột cho uống cao chiết phân đoạn lá chè đắng	93
Hình 3.22. Cấu trúc phân tử của H4 (24 methyl (3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid) ester)	95
Hình 3.23. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của một số hoạt chất	98
Hình 3.24. Các đối tượng thực vật là thành phần của chế phẩm Thivoda	100
Hình 3.25. Nghiên cứu khả năng điều hòa đường huyết của cao tổng số	102
Hình 3.26. Chỉ số men gan (trái) và các chỉ số mỡ máu (phải)	103
Hình 3.27. Dụng cụ đóng viên nang (trái), chế phẩm Thivoda (phải)	105
Hình 3.28. Khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda và Metformin	106

MỞ ĐẦU

Đã từ lâu con người biết rằng đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh rối loạn chuyển hóa, nhưng những biến chứng mà nó gây ra thì gần đây mới được làm sáng tỏ. Ảnh hưởng của bệnh đái tháo đường đến các bệnh lý khác rất nặng nề. Ngày nay đái tháo đường được xếp vào nhóm bệnh không lây cùng với các bệnh phổ biến khác đang được cả loài người - tất cả các quốc gia, đồng tâm hợp sức phòng chống. Bệnh đái tháo đường cũng được xem là “đại dịch” ở các nước đang phát triển [2].

Từ những năm 90 của thế kỷ 20, các chuyên gia y tế đã dự báo “*Thế kỷ 21 là thế kỷ của các bệnh rối loạn chuyển hóa*”. Theo ước tính của Tổ chức Y tế thế giới WHO và Liên đoàn ĐTĐ quốc tế IDF, số bệnh nhân ĐTĐ sẽ tăng từ 150 triệu người vào năm 2009 lên 399 triệu người vào năm 2025, tăng 214% so với năm 2006. Đáng chú ý là tốc độ gia tăng tỷ lệ mắc bệnh ở các nước phát triển chỉ là 42% thì ở các nước đang phát triển trong đó có VN là 170%. Bệnh ĐTĐ có thể gây ra nhiều biến chứng nguy hiểm và là nguyên nhân hàng đầu gây nhồi máu cơ tim, đột quy, suy thận giai đoạn cuối và mù lòa... làm tăng tỷ lệ tử vong lên gấp 2-4 lần so với người không bị ĐTĐ. Trên thế giới cứ 10 giây đi qua có thêm 1 người bị chết do ĐTĐ và các biến chứng. Bệnh ĐTĐ đã thực sự trở thành một gánh nặng cho mỗi gia đình có người mắc bệnh, cho cả hệ thống y tế và cho toàn xã hội. Hiện bệnh chiếm tỷ lệ cao nhất về số lượng các công trình nghiên cứu, tạp chí và sách báo chuyên ngành [15, 99].

Ở nước ta, việc điều trị bệnh ĐTĐ còn gặp rất nhiều khó khăn do đội ngũ thầy thuốc chuyên khoa còn thiếu, chi phí điều trị tốn kém do người bệnh được phát hiện muộn và có nhiều biến chứng; công tác giáo dục cho người bệnh chưa được tốt. Trong những năm qua, ngành y tế đã có nhiều nỗ lực trong công tác đào tạo các thầy thuốc chuyên khoa nội tiết ĐTĐ, tăng cường kinh phí và cung cấp các thuốc thiết yếu chữa bệnh ĐTĐ cho các cơ sở y tế, đẩy mạnh công tác tuyên truyền phòng chống bệnh...nhưng chưa đạt được kết quả mong muốn. Việc sử dụng các thực phẩm bổ sung có nguồn gốc từ thực vật cho các bệnh nhân ĐTĐ sẽ có tác dụng phối

hợp với việc điều trị bằng thuốc, giúp hỗ trợ điều trị cho người bệnh một cách hiệu quả hơn [10].

Việt Nam ta rừng vàng biển bạc, sở hữu nguồn tài nguyên thực vật nói chung, tài nguyên thực vật chứa các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học nói riêng rất đa dạng, phong phú. Đây là nguồn dược liệu quý, tiềm năng và triển vọng, có giá trị kinh tế và xã hội rất lớn lao. Ngày nay, với sự phát triển của các ngành sinh học, hóa học các hợp chất tự nhiên và dược học hàng chục ngàn hoạt chất có trong cây cỏ đã được phát hiện, được nghiên cứu, chế biến và làm thuốc chữa bệnh.

Có thể nói nguồn hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mà cây cỏ có khả năng sinh tổng hợp và tích lũy là vô cùng to lớn và hiểu biết của con người về chúng chỉ là một phần rất nhỏ và còn rất nhiều hạn chế. Do đó việc điều tra, nghiên cứu các cơ sở khoa học để phát hiện, khai thác, sử dụng có hiệu quả cũng như bảo tồn, phát triển bền vững nguồn tài nguyên thực vật chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học là nhiệm vụ lớn đã và đang đặt ra trước chúng ta.

Xuất phát từ những yêu cầu và thực tế trên đây, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: ***“Điều tra, nghiên cứu một số thực vật Việt Nam có tác dụng hỗ trợ điều hoà lượng đường trong máu để ứng dụng cho bệnh nhân đái tháo đường type 2”***.

Mục đích nghiên cứu của đề tài:

- ***Điều tra, sàng lọc một số thực vật Việt Nam có tác dụng hạ đường huyết trên chuột nhắt đái tháo đường type 2.***
- ***Xác định các cao chiết phân đoạn của một số thực vật có tác dụng hạ đường huyết tốt nhất.***
- ***Xác định thành phần hóa học của các phân đoạn có tác dụng hạ đường huyết, tinh sạch các chất và làm sáng tỏ cơ chế hạ đường huyết của chúng.***
- ***Bào chế chế phẩm có nguồn gốc từ các thực vật đã được sàng lọc, nghiên cứu khả năng và cơ chế hạ đường huyết, xác định độc tính cấp của chế phẩm.***

Nội dung nghiên cứu:

- *Thu thập 24 mẫu thực vật ở Việt Nam được tham khảo là có khả năng trong hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ. Tách chiết thu cao nước nóng và cao cồn, thử nghiệm khả năng hạ đường huyết trên chuột nhắt ĐTĐ type 2.*
- *Chiết phân đoạn cao nước nóng lá vòi và lá chè đắng bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần và nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của các phân đoạn đó trên chuột nhắt ĐTĐ type 2.*
- *Xác định thành phần hóa học của cao chiết phân đoạn có tác dụng hạ đường huyết tốt nhất.*
- *Thử nghiệm khả năng ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết phân đoạn và các chất tinh sạch được.*
- *Nghiên cứu bào chế chế phẩm, khả năng hạ đường huyết, xác định độ an toàn về chỉ tiêu vi sinh vật, độc tính cấp cũng như hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của chế phẩm sinh học.*

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

1.1.1. Khái niệm và phân loại bệnh đái tháo đường

1.1.1.1. Khái niệm

Danh từ bệnh ĐTD (Diabetes mellitus) có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp (diabetes: nước chảy trong ống siphon) và tiếng La Tinh (mellitus: ngọt), do vậy danh từ y học Việt Nam đã dịch diabetes mellitus là ĐTD. Tuy nhiên cần phân biệt có nhiều loại đường có trong nước tiểu nhưng không phải là ĐTD như fructose niệu, pentose niệu ngay cả khi đái ra glucose cũng có thể do ngưỡng thận thấp hoặc do chấn thương sọ não. Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ĐTD là “một hội chứng có đặc tính biểu hiện bằng tăng glucose máu do hậu quả của việc thiếu/hoặc mất hoàn toàn insulin hoặc do có liên quan đến sự suy yếu trong bài tiết và hoạt động của insulin” [99].

Còn theo Hiệp hội ĐTD Hoa Kỳ đã đưa ra định nghĩa về ĐTD: “là một rối loạn mạn tính, có những thuộc tính như sau: tăng glucose máu; kết hợp với những bất thường về chuyển hóa carbohydrate, lipid và protein; bệnh luôn gắn với xu hướng phát triển các bệnh lý về thận, đáy mắt, thần kinh và các bệnh tim mạch khác”. Các chuyên gia thuộc Ủy ban chẩn đoán và phân loại bệnh ĐTD Hoa Kỳ đã đưa ra định nghĩa mới về ĐTD: “là một nhóm các bệnh chuyển hóa có đặc điểm là tăng glucose máu, hậu quả của sự thiếu hụt tiết insulin, khiếm khuyết trong hoạt động của insulin, hoặc cả hai”.

Nói tóm lại: “ĐTD là một tình trạng rối loạn chuyển hóa phức tạp do nhiều nguyên nhân, đặc trưng bởi sự tăng glucose máu, do khiếm khuyết tiết insulin, và/hoặc đề kháng insulin. Tình trạng tăng đường huyết mạn tính sẽ gây ra tổn thương của nhiều cơ quan như mắt, thận, thần kinh, tim và mạch máu” [2, 43].

Bảng 1.1 thể hiện tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh ĐTD, được Hiệp hội ĐTD của Mỹ kiến nghị năm 1997 và được nhóm các chuyên gia về bệnh ĐTD của WHO công nhận vào năm 1998, tuyên bố áp dụng vào năm 1999 [15].

Bảng 1.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh ĐTD

Đường huyết tương bất kỳ ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) kèm triệu chứng tiểu nhiều, uống nhiều, sụt cân.
Đường huyết lúc đói ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) sau 2 lần thử.
Đường huyết tương 2 giờ sau uống 75 g glucose ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

Ngoài ra còn có các chỉ tiêu phân đầu điều trị người bệnh ĐTD được Tổ chức ĐTD quốc tế cũng như WHO khuyến cáo, được thể hiện ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Tiêu chuẩn đánh giá kết quả xét nghiệm của người bệnh ĐTD theo WHO-năm 2002

Chỉ số	Đơn vị	Tốt	Khá	Kém
Đường huyết				
- Lúc đói	mmol/l	4,4 – 6,1	$\leq 7,0$	$> 7,0$
- Sau ăn		4,4 – 8,0	$\leq 10,0$	$> 10,0$
HbA ₁ C	%	$< 6,5$	6,5 – 7,5	$> 7,5$
Huyết áp	mmHg	$< 130/80$	$> 130/80 - < 140/90$	$> 140/90$
BMI	kg/m ²	18,5 – 22,9	18,5 – 22,9	≥ 23
Cholesterol toàn phần	mmol/l	$< 4,5$	4,5 – 6,0	$> 6,0$
HDL-c	mmol/l	$> 1,1$	1,1 – 0,9	$< 0,9$
Triglyceride	mmol/l	$< 1,5$	1,5 – $< 2,2$	$\geq 2,2$
LDL-c	mmol/l	$< 2,5$	2,5 – 4,0	$> 4,0$

1.1.1.2. Phân loại

Phân loại dựa vào nguyên nhân sinh bệnh:

a. ĐTD type 1: Tuyến tụy của bệnh nhân hầu như hoặc không có khả năng sản sinh ra insulin. Nguyên nhân là do hệ miễn dịch tự hủy hoại các tế bào β trong tuyến tụy có nhiệm vụ sản sinh ra insulin. Tác nhân kích thích để cho hệ miễn dịch tấn công tế bào β vẫn chưa biết rõ. Bởi vậy, trước đây còn gọi ĐTD type 1 là bệnh tự miễn. Bệnh chiếm khoảng 10-20% các trường hợp ĐTD.

Bệnh nhân mắc bệnh ĐTD type 1 buộc phải tiêm insulin hằng ngày, có thể là vài lần trong ngày. Để hạ đường máu, ngoài tiêm insulin người bệnh còn phải điều chỉnh và phối hợp thuốc theo chế độ ăn và hoạt động thể lực. Hạ đường huyết là

nguy cơ tiềm ẩn đe dọa tính mạng của người bệnh ĐTĐ type 1. Mặc dù đã được cảnh báo và người ta đã nghiên cứu tìm ra nhiều biện pháp phòng chống, bảo vệ an toàn cho người bệnh nhưng các biến chứng xảy ra ngày càng nhiều. Do đó, chiến lược dự phòng nhằm tác động vào các giai đoạn sớm nhằm ngăn chặn sự diễn tiến của bệnh được xem như là phương thức tốt nhất giúp hạn chế những tổn thương nặng nề về tinh thần, vật chất cho mỗi cá nhân và cho toàn xã hội [65, 70].

b. ĐTĐ type 2: Đặc điểm lớn nhất trong sinh lý bệnh của ĐTĐ type 2 là có sự tương tác giữa yếu tố gen và yếu tố môi trường trong cơ chế bệnh sinh. Đây là mối quan hệ phức tạp.

Bệnh nhân ĐTĐ type 2 có lượng insulin ban đầu được sản sinh ra hoàn toàn bình thường, nhưng các tế bào đã không hoặc kém nhạy cảm với sự có mặt của insulin. Đó là hiện tượng kháng insulin. Lượng đường trong máu do không được chuyển hóa thành năng lượng nên giữ ở mức cao, cơ thể bệnh nhân phản ứng bằng cách tăng sản xuất insulin, gây nên quá tải cho tuyến tụy và lượng insulin được tiết ra dần dần giảm.

ĐTĐ type 2 chủ yếu ở người trưởng thành, nhưng bệnh đang gia tăng gấp cả ở những người trẻ tuổi, thậm chí ở cả trẻ em, bệnh thường gặp ở những người trên 40 tuổi. Số người mắc bệnh ĐTĐ type 2 chiếm khoảng 80% - 90% tổng số ca ĐTĐ. Sinh bệnh học của bệnh vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Tuy nhiên, hai yếu tố đóng vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh của ĐTĐ type 2 là khiếm khuyết chức năng tế bào β tuyến tụy và hiện tượng kháng insulin. Giữa hai yếu tố, yếu tố nào xuất hiện trước và chiếm ưu thế cho đến nay vẫn chưa được xác định.

Đái tháo đường type 2 có nguyên nhân tiềm ẩn trong cấu tạo gen, nó làm cho bệnh phát triển nhanh. Nếu những người mang trong mình gen tạo mầm mống cho bệnh ĐTĐ sớm biết được điều đó và có biện pháp phòng ngừa bằng cách sống và ăn uống tốt thì bệnh có thể không phát triển. Bệnh ĐTĐ trong trường hợp này sẽ giữ ở dạng tiềm ẩn. Trong trường hợp ngược lại, với cách sống không khoa học, căn bệnh sẽ phát triển rất nhanh [46, 110].

c. ĐTĐ thai kỳ: là tình trạng không dung nạp carbohydrate của người phụ nữ được phát hiện lần đầu khi mang thai. Các nghiên cứu kinh điển của Freinkel đã chứng minh ở người ĐTĐ thai kỳ, trong thời kỳ mang thai insulin tăng tiết gấp 1,5 – 2 lần khi đáp ứng với nghiệm pháp dung nạp glucose bằng đường uống hay truyền tĩnh mạch. Rõ ràng cả lượng insulin dự trữ lẫn khả năng đáp ứng bài tiết mới của tế bào beta đã bị giới hạn. Đây cũng là nguyên nhân dẫn đến hiện tượng không dung nạp glucose ở người mẹ. Các bất thường về chuyển hóa bao gồm tiết insulin mất cân đối và các tác động của nó đến quá trình thu nhận glucose, ngăn chặn sản xuất glucose ở gan và giảm tuyệt đối sử dụng glucose được insulin hoạt hóa.

ĐTĐ thai kỳ xảy ra ở khoảng 2 – 3% tổng số phụ nữ mang thai và khi hormon được sản xuất bởi nhau thai bị gián đoạn do ảnh hưởng của insulin. ĐTĐ thai kỳ biến mất ngay sau khi sinh nhưng có khoảng 1/2 trong số này tiến triển thành ĐTĐ type 2 vĩnh viễn sau sinh. Trong những trường hợp hiếm gặp, ĐTĐ type 1 cũng có thể xảy ra trong thai kỳ, dẫn đến nồng độ glucose trong máu cao sau khi sinh mà đòi hỏi phải điều trị bằng insulin [68].

d. Các tình trạng tăng đường huyết đặc biệt khác:

- | | |
|---|--|
| + Giảm chức năng tế bào do khiếm khuyết gen | + Tăng đường huyết do thuốc, hóa chất |
| + Giảm hoạt tính insulin do khiếm khuyết gen | + Nhiễm khuẩn |
| + Bệnh lý tụy ngoại tiết | + Bệnh nội tiết |
| + Các thể không thường gặp của ĐTĐ qua trung gian miễn dịch | + Một số bệnh gen đôi khi kết hợp với ĐTĐ. |

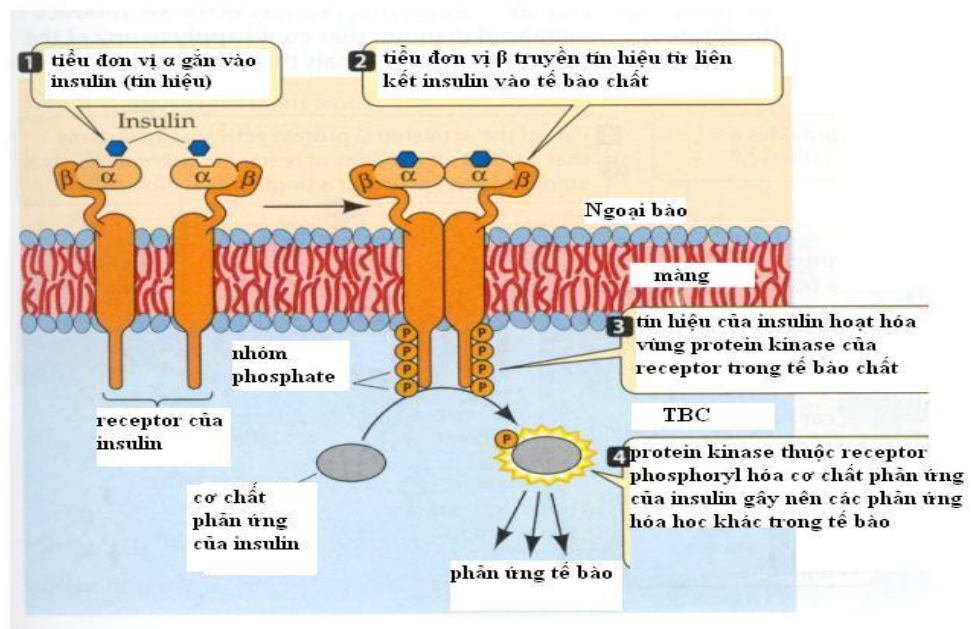
1.1.2. Bệnh ĐTĐ type 2 và tính kháng insulin

1.1.2.1. Cơ chế tác dụng của insulin

Insulin là một protein nhỏ, trọng lượng phân tử 5800Da, là một phức hợp có 51 amino acid và gồm 2 chuỗi, chuỗi A có 21 amino acid, chuỗi B có 30 amino acid, nối với nhau bởi 2 cầu nối disulfide. Insulin được tổng hợp từ tế bào β tuyến tụy, các tế bào khác trong tiểu đảo tụy là tế bào α (sản xuất glucagon) và tế bào δ

(sản xuất somatostatin), tế bào γ sản xuất polypeptide tuyến tụy, và tế bào ϵ được phát hiện và xác định là sản xuất ghrelin.

Bản thân Receptor (R) của insulin là một protein kinase có khả năng vận chuyển một nhóm phosphate của ATP tới nhóm hydroxyl của một gốc Tyrosine, gồm 2 tiểu đơn vị α (trọng lượng phân tử 140 kDal) giống nhau nằm ở mặt ngoài của màng plasma và 2 tiểu đơn vị β (trọng lượng phân tử 95 kDal) xuyên qua màng với các đầu C tận cùng ở mặt ngoài của bào tương. Các chuỗi α chứa vùng liên kết insulin, còn các chuỗi β là vùng tyrosine kinase, các chuỗi liên kết với nhau bởi cầu nối disulfide. Liên kết insulin ở khu vực ngoài tế bào hoạt hóa tyrosine protein kinase đặc hiệu của R nằm trong bào tương. Kinase này lại hoạt hóa tiếp nhiều protein kinase khác bằng phản ứng phosphoryl hóa các gốc Tyr đặc hiệu. Cuối cùng những enzyme này có thể phosphoryl hóa enzyme quan trọng khác để gây ra nhiều biến đổi về chuyển hóa trong cơ thể [104]. Cơ chế tác dụng của insulin được thể hiện trên Hình 1.1 và cơ chế phân tử giải phóng insulin được thể hiện trên Hình 1.2.

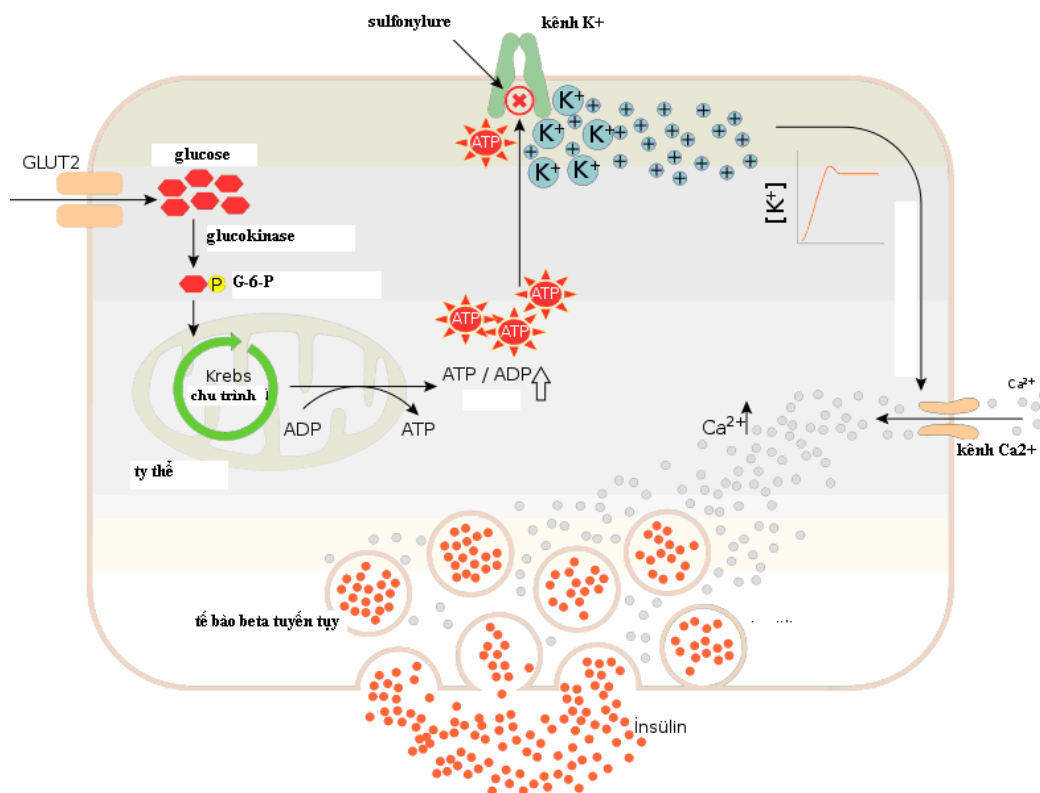


Hình 1.1. Cơ chế tác dụng của insulin

(Nguồn hình: <http://www.daftblogger.com/regulatory-and-effective-mechanisms-of-insulin/insulin-receptor/>)

Insulin được dự trữ trong tế bào tiết insulin, sau đó được giải phóng để đáp ứng với sự tăng cao của nồng độ Ca^{2+} nội bào. Nguyên nhân là dòng Ca^{2+} đi qua màng tế bào, xuyên qua cổng điện thế kênh Ca^{2+} . Khi kênh này mở sẽ khởi động hoạt động điện tế bào beta. Glucose điều khiển hoạt động điện của tế bào beta theo con đường trao đổi chất, dẫn đến sự thay đổi trong hoạt động của kênh Ca^{2+} (kênh K_{ATP} nhạy cảm với ATP).

Khi không có mặt glucose, kênh K^+ mở ra và dòng K^+ giữ cho màng không bị phân cực cao, vì vậy cổng điện thế kênh Ca^{2+} đóng lại. Khi trao đổi chất glucose, kênh K_{ATP} đóng lại và khử cực màng tế bào beta, dẫn đến mở cổng điện thế kênh Ca^{2+} và khởi động hoạt động điện.



Hình 1.2. Cơ chế phân tử giải phóng insulin

(Nguồn: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucose_Insulin_Release_Pancreas.svg)

Kênh K_{ATP} cũng được coi là đích phân tử trong nghiên cứu bào chế thuốc chống ĐTD như sulfonyleurea, đây là loại thuốc được sử dụng rộng rãi để điều trị bệnh ĐTD type 2 trong hơn một nửa thập kỷ qua. Sulfonyleurea có tác dụng đóng các kênh này để

lập với trao đổi chất glucose, do đó nó không ảnh hưởng đến quá trình tiết insulin và hoạt động điện [73].

1.1.2.2. Tính kháng insulin

Kháng insulin là thuật ngữ đầu tiên dùng để chỉ những bệnh nhân ĐTĐ type 1 khi phải điều trị dùng đến hay nhiều hơn 100 đơn vị insulin một ngày mới kiểm soát được đường huyết. Tính kháng insulin được định nghĩa là đáp ứng sinh học dưới mức bình thường đối với nồng độ insulin đã dùng để điều trị tốt như các mô của các đối tượng không bị bệnh ĐTĐ. Thuật ngữ “hội chứng X” hay “hội chứng trao đổi chất” đã được dùng để chỉ các đối tượng biểu hiện các đặc tính kháng lại insulin và thuật ngữ này đã được định nghĩa rõ ràng hơn bởi Chương trình giáo dục quốc gia về Cholesterol - NCEP (National Cholesterol Education Program) và được sửa đổi bởi WHO, đã thêm các yêu cầu về hiện tượng nồng độ insulin quá cao hay lượng glucose trong huyết tương lúc đói cao (lớn hơn 110 mg/dl nhưng nhỏ hơn 126 mg/dl) [123]. Định nghĩa của NCEP về hội chứng trao đổi chất trình bày tại Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Định nghĩa của NCEP về hội chứng trao đổi chất

Glucose trong huyết tương lúc đói >110 mg/dl
Béo phì vùng bụng (vòng eo >102 cm (đối với nam giới), >88 cm (đối với phụ nữ))
Hàm lượng các triglyceride trong huyết thanh >150 mg/dl
Hàm lượng HDL cholesterol trong huyết thanh <40 mg/dl (đối với nam giới), <50 mg/dl (đối với phụ nữ)
Huyết áp >130/85 mmHg

Ngày nay thuật ngữ kháng insulin không còn mang ý nghĩa đơn thuần trong điều trị mà chủ yếu dùng để chỉ tình trạng kháng insulin ở bệnh nhân ĐTĐ, tăng huyết áp, béo phì, rối loạn chuyển hóa lipid và kháng insulin được định nghĩa là tình trạng giảm đáp ứng sinh học của các tế bào, cơ quan, tổ chức đối với tác động của insulin. Kháng insulin được coi là giai đoạn rất sớm, giai đoạn tiền lâm sàng và thường có trước nhiều năm khi ĐTĐ type 2 xuất hiện [62, 66].

Đặc điểm nổi bật của sinh lý bệnh ĐTĐ type 2 là những rối loạn không đồng nhất biểu hiện bằng giảm nhạy cảm với insulin ở gan, cơ vân, mô mỡ và sự suy giảm chức năng của tế bào beta biểu hiện bằng những rối loạn tiết insulin. Để duy trì nồng độ đường huyết bình thường cần có sự điều hòa 3 yếu tố về insulin: một là bài tiết insulin từ tế bào beta, hai là quá trình thu nạp và sử dụng insulin ở mô ngoại vi (chủ yếu từ cơ vân và một phần ở mô mỡ), thứ ba là ức chế sản xuất insulin ở gan (một phần là ở ruột).

Vấn đề nổi cộm trong sinh lý bệnh ĐTĐ type 2 chủ yếu xoay quanh câu hỏi, kháng insulin có trước (tức suy giảm hoạt động của insulin) hay suy giảm bài tiết insulin (suy giảm chức năng tế bào beta) có trước. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự suy yếu chức năng bài tiết insulin của tế bào beta đã có ngay từ khi người bệnh có rối loạn dung nạp đường huyết lúc đói (giai đoạn tiền ĐTĐ). Nhưng cũng có nhiều ý kiến cho rằng chính những khiếm khuyết trong hoạt động của insulin là nguyên nhân gây suy giảm bài tiết của insulin dẫn đến tăng đường huyết và sau cùng chính sự tăng đường huyết lại có tác động ngược lại làm suy giảm khả năng hoạt động của insulin.

Trong thực tế khi đường huyết đã ở mức cao (>10 mmol/l) thì cả quá trình bài tiết insulin của tế bào và khả năng hoạt động của insulin đều bị suy giảm nặng. Về khái niệm kháng insulin, xuất phát từ nhận xét: “trong bệnh ĐTĐ type 2 nhiều khi lượng glucose trong máu tăng mà mức insulin máu vẫn bình thường thậm chí còn tăng cao”. Như vậy, “kháng insulin máu xảy ra khi tế bào không đáp ứng hoặc bản thân tế bào chống lại sự tăng insulin máu”. Trong ĐTĐ type 2 kháng insulin được xem là giai đoạn sớm của quá trình tiến triển bệnh. Thực tế, ngay ở giai đoạn này cùng với kháng insulin, nhiều rối loạn khác đã xảy ra. Cũng từ thực tế rất nhiều người bệnh ĐTĐ type 2 có nồng độ insulin trong máu bình thường thậm chí tăng cao, ngay sau khi ăn hoặc uống đường, người ta đã đặt ra giả thuyết là có sự suy giảm hoạt động của insulin nội sinh. Sự suy giảm này có thể xảy ra ở các khâu như giảm độ nhạy của insulin, giảm đáp ứng trong bài tiết insulin và cuối cùng là do cả

hai nguyên nhân, vừa giảm độ nhạy vừa giảm đáp ứng. Ở những người mắc bệnh “đái tháo đường kháng insulin”, tuy cơ thể vẫn tiết ra insulin bình thường nhưng các tổ chức lại không đáp ứng được với chính insulin tiết ra và cả insulin ngoại sinh. Đó là do hiện tượng đột biến trong vùng tyrosine kinase của receptor làm enzym này không hoạt động, do đó không thể xảy ra chuỗi phản ứng tiếp theo mặc dù vẫn còn insulin gắn vào R [106]. Cấu trúc của receptor insulin và vùng tyrosine kinase thể hiện trên Hình 1.3.

L1: Domain lớn 1

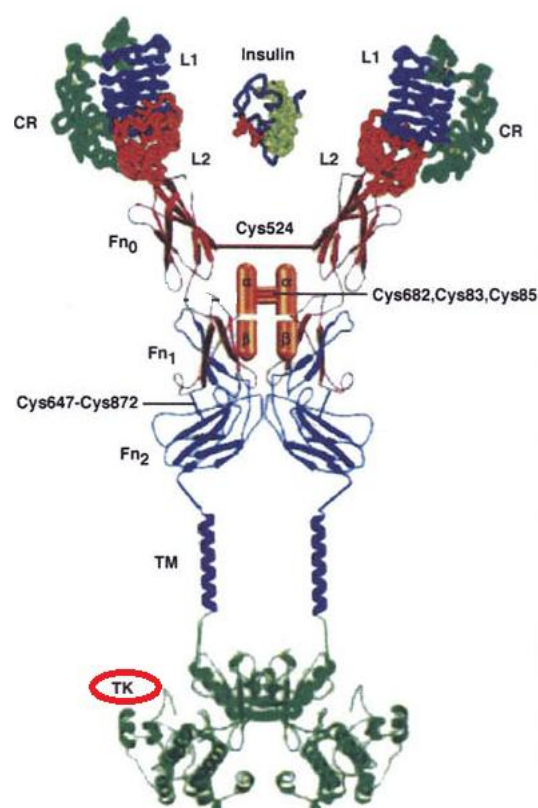
L2: Domain lớn 2

Fn₀, Fn₁, Fn₂: ba fibronectin type 3

TM: Domain xuyên màng

TK: Tyrosine kinase

CR: Vùng giàu cysteine



Hình 1.3. Receptor của insulin và vùng tyrosine kinase [104]

1.1.3. Biến chứng bệnh đái tháo đường

Có hai loại biến chứng: biến chứng cấp tính hôn mê tăng đường máu và biến chứng mạn tính.

- Biến chứng cấp tính như hôn mê nhiễm toan ceton và hôn mê tăng áp lực thẩm thấu gặp khi bệnh nhân không được điều trị tốt, đường máu tăng lên quá cao có thể đe dọa trực tiếp đến tính mạng của bệnh nhân. Nhiều khi bệnh nhân được chẩn đoán bệnh ĐTĐ trong tình trạng đường máu tăng cấp tính này chứng tỏ hiệu

biết của cộng đồng về bệnh ĐTĐ còn rất hạn chế, các triệu chứng của bệnh đã tương đối rõ ràng trước đó khá lâu nhưng không được chẩn đoán và điều trị kịp thời.

- Biến chứng mạn tính đặc trưng của bệnh ĐTĐ bao gồm:

- + Bệnh lý võng mạc do ĐTĐ
- + Bệnh cầu thận do ĐTĐ
- + Bệnh thần kinh do ĐTĐ

là những bệnh lý liên quan đến tổn thương mạch máu nhỏ.

Quá trình gây nên biến chứng bệnh có thể hình dung như sau: đường máu cao mạn tính làm gia tăng sự gắn kết đường với các protein (chất đạm) trong các màng tế bào trong đó có các mạch máu. Sự gắn kết này khiến cho chức năng của các cơ quan rối loạn.

Đối với mắt là quá trình tắc mạch máu nuôi dưỡng đáy mắt, hình thành các mạch máu mới rất yếu và dễ vỡ gây chảy máu đáy mắt và tình trạng mù lòa. Bệnh võng mạc do ĐTĐ là nguyên nhân gây mù hàng đầu ở người lớn từ 20-74 tuổi ở Mỹ. Tại thời điểm mới được chẩn đoán đã có từ 10-20% số người mắc ĐTĐ type 2 có bệnh lý võng mạc do ĐTĐ. Sau 20 năm mắc bệnh, hầu hết bệnh nhân ĐTĐ type 1 và khoảng 60% bệnh nhân ĐTĐ type 2 có bệnh lý võng mạc do ĐTĐ.

Đối với thận quá trình trên làm dày màng đáy cầu thận và dẫn đến giảm dần chức năng thận và suy thận phải lọc máu chu kỳ. Khoảng 20-30% bệnh nhân ĐTĐ mắc bệnh thận, là nguyên nhân suy thận giai đoạn cuối hàng đầu ở các nước công nghiệp phát triển ở Mỹ và châu Âu [27, 55].

Tổn thương thần kinh do ĐTĐ rất phức tạp, tuy nhiên có một số tổn thương điển hình như biến chứng bàn chân đau, tê, mất cảm giác nguy cơ cao bị loét và cắt cụt chi; biến chứng thần kinh tự động gây liệt dạ dày, liệt dương....

Ngoài ra phải kể đến các bệnh khác tuy không phải là biến chứng trực tiếp của bệnh ĐTĐ song thực sự bệnh ĐTĐ làm gia tăng 3-4 lần các bệnh tim mạch như tăng huyết áp, nhồi máu cơ tim, đột quỵ, tắc mạch chi...[109].

1.1.4. Tình hình bệnh đái tháo đường trên thế giới và tại Việt Nam

1.1.4.1. Tình hình bệnh ĐTD trên thế giới

Theo một thông báo vào năm 1998 của các chuyên gia thuộc Tổ chức ĐTD quốc tế, tỷ lệ người mắc bệnh ĐTD trên toàn thế giới là: 110 triệu người vào năm 1994, 135 triệu người vào năm 1995, dự kiến năm 2000 là 151 triệu người. Tuy nhiên con số thống kê thực tế cho thấy số bệnh nhân ĐTD trên toàn thế giới trong năm 2000 là 171 triệu người (chiếm 2,8% dân số thế giới), tức là vượt 13% so với dự đoán của năm 1998. Ước tính hiện có 366 triệu người trên thế giới bị bệnh ĐTD, số lượng ca bệnh ĐTD trên toàn cầu tăng gấp đôi trong ba thập kỷ qua.

Trong các trường hợp mắc bệnh ĐTD, ĐTD type 2 chiếm đa số. Tỷ lệ mắc bệnh tăng nhanh ở các nước đang phát triển là do sự thay đổi về lối sống, thói quen ăn uống, đặc biệt là lối sống ít vận động thể lực. ĐTD type 2 tiến triển một cách âm thầm và liên tục, nếu không được theo dõi và quản lý, điều trị tốt sẽ gây nhiều biến chứng nguy hiểm để lại di chứng nặng nề và đe dọa tính mạng người bệnh và là một trong những nguyên nhân tử vong chính của bệnh ĐTD. Theo khuyến cáo của Tổ chức IDF, trên thế giới mỗi năm có khoảng 3,2 triệu người chết vì bệnh ĐTD, như vậy một ngày có 8700 người và mỗi phút có 6 người chết do ĐTD. Trong số 17 triệu người chết vì đột quỵ tim mạch thì có 50-70% là do nguyên nhân của bệnh ĐTD, nhất là ĐTD type 2 thường do phát hiện bệnh muộn. Có 30-90% ĐTD type 2 không được chẩn đoán và 50% bệnh nhân đã có một hoặc nhiều biến chứng vào thời điểm phát hiện bệnh. Nhiều bệnh nhân khi phát hiện bệnh lại không được quản lý, theo dõi và điều trị đúng chuyên khoa dẫn đến biến chứng sớm và nặng nề ảnh hưởng đến đời sống của người bệnh, đồng thời tổn kém kinh tế của gia đình và ngân sách xã hội [59, 118].

Trong thời gian gần đây, xu hướng gia tăng bệnh ĐTD type 2 ở trẻ em và vị thành niên ngày càng đáng kể (Việt Nam 1%, Naru 30%). Quản lý tốt bệnh nhân ĐTD nghĩa là kiểm soát tốt đường huyết và các yếu tố liên quan như: huyết áp, lipid máu và các yếu tố nguy cơ. Việc kiểm soát chặt chẽ trên bệnh nhân ĐTD type 2 bằng nhiều phương pháp điều trị làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong và mức độ tàn phế.

1.1.4.2. Tình hình bệnh ĐTD tại Việt Nam

Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh ĐTD của các khu vực đã được điều chỉnh theo cấu trúc tuổi của quần thể là: tỷ lệ mắc bệnh ĐTD toàn quốc là 2,7%, tỷ lệ mắc ĐTD ở nữ là 3,7%, tỷ lệ tương ứng ở nam là 3,3%. Tỷ lệ mắc ĐTD ở vùng núi cao là 2,1%, vùng trung du là 2,2%, vùng đồng bằng ven biển là 2,7%, vùng đô thị và công nghiệp là 4,4%. Đặc biệt tỷ lệ mắc bệnh ĐTD ở nhóm đối tượng có yếu tố nguy cơ, tuổi từ 30 đến 64 chiếm tỷ lệ 10,5%, tỷ lệ rối loạn dung nạp glucose là 13,8%. Theo phân loại của Hiệp hội Đái tháo đường quốc tế và Tổ chức Y tế Thế giới, tỷ lệ mắc bệnh ĐTD ở Việt Nam nằm trong khu vực hai (tỷ lệ 2% - 4,99%) giống của các nước khác trong khu vực như Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia và thấp hơn các nước thuộc khu vực ba (tỷ lệ 5% - 7,99%) bao gồm Nhật Bản, Hàn Quốc, Malaysia, Singapore, Australia...

Tỷ lệ mắc ĐTD ở VN tăng tỷ lệ thuận theo tuổi ($p < 0,0005$). Ở lứa tuổi dưới 40 tỷ lệ mắc bệnh ĐTD vẫn thấp khoảng dưới 1%, tỷ lệ bệnh ĐTD dường như tăng nhanh ở hai mốc tuổi là 45 (4,6%) và 60 tuổi (10,1%). Tỷ lệ rối loạn dung nạp glucose cũng có diễn biến gần giống như tỷ lệ mắc bệnh ĐTD là tăng tỷ lệ thuận theo tuổi ($p < 0,0005$) nhưng không có mức tăng đột ngột như tỷ lệ bệnh ĐTD. Tuổi trung bình của các đối tượng mắc bệnh ĐTD là 52,4 tuổi. Hầu hết người bị bệnh ĐTD đã được chẩn đoán từ trước đều đang được điều trị đều đặn (85,8%), số người bệnh không được điều trị chỉ có 14,2%. Chế độ điều trị được áp dụng chủ yếu là thuốc đơn thuần (70,9%), thuốc kết hợp với chế độ ăn (29,1%), chế độ ăn và luyện tập đơn thuần chỉ có 2,9%. Điều này phản ánh thực tế còn yếu trong công tác quản lý nhóm người có yếu tố nguy cơ mắc bệnh cao trong cộng đồng và nhóm người mới được chẩn đoán chỉ cần chế độ ăn và luyện tập để điều chỉnh lượng đường huyết. Điểm đặc biệt cần lưu ý là tỷ lệ người được chẩn đoán ĐTD chỉ có 35,5% tức là có tới 64,5% người mắc bệnh ĐTD không được chẩn đoán, cá biệt có những vùng tỷ lệ người không được chẩn đoán bệnh lên tới 69,7% [2, 15].

1.2. SỬ DỤNG THUỐC VÀ THẢO DƯỢC TRONG ĐIỀU TRỊ ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

1.2.1. Sử dụng thuốc trong điều trị đái tháo đường

Các chiến lược điều trị hiện nay cho người mắc bệnh ĐTD type 1 và type 2 tuân theo các nguyên tắc hướng vào mục tiêu toàn diện, dựa trên tầm quan trọng của việc kiểm soát chuyên hóa và quản lý tốt các yếu tố nguy cơ. Giảm đường huyết vừa là mục tiêu chính của kiểm soát chuyên hóa glucose, vừa là phương tiện quản lý yếu tố nguy cơ do tăng đường huyết gây ra (trực tiếp hoặc gián tiếp). Cải thiện kiểm soát đường huyết làm chậm sự khởi phát và giảm mức độ nặng của các biến chứng vi mạch. Người ta thấy việc duy trì mức đường huyết bình thường có lợi không chỉ trước mắt mà còn về lâu dài. Có điều những thuốc điều trị ĐTD hiện có không phục hồi được cân bằng nội môi sinh lý bình thường, thậm chí cả khi điều trị tích cực. Đây là nguyên nhân giải thích tại sao các biến chứng mạn tính của ĐTD vẫn là gánh nặng, cũng là nguyên nhân nhu cầu cấp bách về những thuốc mới, tốt hơn cho điều trị tăng đường huyết.

Những đặc điểm sinh bệnh khác nhau của ĐTD type 1 và 2 là cơ sở của các ưu tiên trị liệu khác nhau. Điều trị ĐTD type 1 đòi hỏi sự thay thế ít nhất là một lượng insulin nào đó hoặc một chất thay thế tương tự, có tác dụng càng giống insulin của cơ thể càng tốt. Chất này không chỉ bảo đảm duy trì chuyển hóa glucose để lấy năng lượng duy trì sự sống và phát triển, mà còn có được phổ các tác dụng rộng lên bộ gen và các ảnh hưởng khác để đảm bảo mức sống còn của các chất vận chuyển, enzym và các con đường chuyển hóa chủ chốt. Khi cần, có thể tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm bắp, tuy nhiên điều trị lâu dài thì ưu tiên là tiêm dưới da. Các chế phẩm của insulin có thể được phân loại theo khoảng thời gian tác dụng: tác dụng ngắn, tác dụng trung bình và tác dụng kéo dài; hoặc theo nguồn gốc như insulin của người, insulin lợn, insulin bò hoặc là hỗn hợp insulin lợn và bò. Insulin người (Humulin, Novolin) hiện nay được dùng rộng rãi do đã sản xuất được theo phương pháp ADN tái tổ hợp, insulin này dễ tan trong nước do sự có mặt của threonine.

Đối với ĐTD type 2, khi còn insulin nội sinh, các thuốc mới có thể nhằm chọn lọc vào các khiếm khuyết nội tiết cơ sở của đề kháng insulin và rối loạn chức

năng tế bào β . Các can thiệp trực tiếp làm giảm sản xuất dư thừa glucose hoặc cải thiện sự sử dụng glucose sẽ luôn được quan tâm, tuy nhiên, việc giảm đường huyết phải bảo đảm an toàn cho các hoạt động sống khác chứ không phải bằng mọi giá. Các kết hợp hai hay nhiều thuốc nhằm vào các tổn thương khác nhau có thể làm tăng thêm hoặc hiệp lực hiệu quả hạ đường huyết. Các kết hợp tiềm tàng các thuốc điều trị các thành phần khác của hội chứng chuyển hóa có thể quản lý rộng hơn nguy cơ tim mạch [10, 52, 83].

Có sự khác biệt giữa các thuốc chống tăng đường huyết và các thuốc gây hạ đường huyết. Cả hai đều làm giảm sự tăng đường huyết, nhưng nhóm thứ hai có thể làm hạ thấp đường huyết dưới mức bình thường, mang nguy cơ hạ đường huyết lâm sàng nghiêm trọng. Điều quan trọng là ở chỗ, trong khi sử dụng các thuốc gây hạ đường huyết nhằm đạt được hiệu quả giảm đường huyết đầy đủ, lại cần phải thận trọng để các thuốc hạ đường huyết mới này không ngăn chặn hoặc làm hư hại nặng quá trình điều hòa đối kháng. Vì thuốc điều trị ĐTĐ phải sử dụng lâu dài, các vấn đề an toàn thuốc như hạ đường huyết, tương tác thuốc, sự dung nạp...đều phải được quan tâm thích đáng. Lý tưởng là các thuốc điều trị ĐTĐ mới không được làm nặng thêm các yếu tố nguy cơ tim mạch hoặc các đặc điểm của hội chứng chuyển hóa, được người bệnh thừa nhận sử dụng thuận tiện, thích hợp với lối sống, nghề nghiệp...Dưới đây là các loại thuốc uống dùng trong điều trị ĐTĐ:

- Các sulfonylurea: các sulfonylurea được chia làm hai nhóm hoặc còn gọi là hai thế hệ. Toàn bộ các chất này đều là dẫn chất của arylsulfonylurea. Nhóm sulfonylurea thế hệ 1 gồm có tolbutamide, tolazamide, acetohexamide và chlorpropamide. Các sulfonylurea hạ đường huyết thế hệ 2 có tác dụng mạnh hơn thế hệ 1, gồm có glibeclamide, glipizide và gliclazide. Các sulfonylurea gây hạ đường huyết là do kích thích sự giải phóng insulin từ tế bào beta tuyến tụy, ngoài ra có thể làm tăng nồng độ insulin bằng cách giảm độ thanh thải insulin ở gan. Tác dụng kích thích của sulfonylurea khi dùng kéo dài trên sự tiết insulin là không đáng kể. Đó là do khi dùng lâu dài, tác dụng của sulfonylurea lên thụ thể ở bề mặt tế bào beta của đảo tụy giảm đi. Nếu lúc này, không dùng sulfonylurea trong một thời gian

thì đáp ứng của tế bào beta tuyến tụy lại phục hồi khi dùng thuốc trở lại. Tác dụng của sulfonyleurea là do thuốc gắn vào và phong bế kênh K^+ , gây ra sự khử cực màng, làm cho Ca^{2+} đi vào tế bào qua kênh Ca^{2+} . Các sulfonyleurea tăng cường tác dụng của insulin trong tế bào và kích thích sự tổng hợp các chất vận chuyển glucose, các sulfonyleurea cũng ức chế sự tân tạo glucose ở gan.

- Các biguanide: có nhiều chất thuộc nhóm biguanide có tác dụng làm hạ đường huyết, trong đó có 3 chất đã từng có mặt trên thị trường là metformin, phenformin và buformin. Không giống với sulfonyleurea, các biguanide không kích thích giải phóng insulin từ các tế bào beta tuyến tụy, làm giảm sự tăng đường huyết sau khi ăn nhưng không gây tai biến tụt đường huyết. Cơ chế tác dụng là cải thiện liên kết của insulin và thụ thể, cụ thể là: tăng cường sử dụng glucose trong tế bào, kích thích trực tiếp sự phân hủy glucose trong các mô và tăng vận chuyển glucose từ máu vào mô; làm giảm sự tân tạo glucose ở gan; làm chậm sự hấp thu glucose qua ruột; làm giảm nồng độ của glucagon trong huyết tương. Ngoài ra các biguanide phần nào có ảnh hưởng tốt trên chuyển hóa lipoprotein.

- Dẫn chất thiazolidindion (còn gọi là thiazolidindion, hoặc glitazon) gồm: ciglitazon, pioglitazon, rosiglitazon, englitazon... làm giảm đường huyết cả lúc đói, cả sau khi ăn ở bệnh nhân ĐTĐ type 2 do làm tăng sự nhạy cảm của tế bào đích đối với insulin. Do đó, sự thu nạp và sử dụng glucose ở các mô ngoại vi (cơ xương, mô mỡ) được tăng cường, sự tân tạo glucose và sự sản sinh glucose ở gan bị ức chế. Các thiazolidindion làm giảm sự kháng insulin nên làm giảm nồng độ đường huyết, insulin huyết và HbA_{1c}. Các thiazolidindion làm tăng tác dụng của insulin ở người bị kháng insulin còn do chúng làm tăng số lượng các chất vận chuyển glucose. Khác với sulfonyleurea, các thiazolidindion không làm tăng sự tiết insulin từ các tế bào beta của tụy, thuốc không có hiệu quả nếu không có insulin. Giống với các biguanide và các chất ức chế α -glucosidase (như acarbose), các thiazolidindion không gây tụt đường huyết ở người không bị ĐTĐ, thậm chí khi dùng liều khá cao, do vậy phải được gọi là thuốc chống tăng đường huyết hơn là thuốc hạ đường huyết.

- Các chất ức chế α -glucosidase: gồm acarbose, miglitol, emigliat, với cơ chế tác dụng làm giảm sự hấp thu qua ruột của tinh bột, dextrin và các disaccharide, làm chậm sự hấp thu carbohydrate, do đó sự tăng đường huyết sau khi ăn giảm ở cả người bình thường và người bệnh ĐTĐ. Acarbose cũng ức chế cạnh tranh với glucomylase và sucrase, nhưng có tác dụng yếu trên α -amylase của tụy. Acarbose có hiệu quả nhất khi dùng chế độ ăn tinh bột, có nhiều xơ và ít glucose, saccharose.

- Các chất ức chế aldose reductase: hiện đã tìm được khá nhiều các chất có tác dụng ức chế aldose reductase như tolrestat, epalrestat, ponalrestat, zenarestat, zopolrestat, pimagedin, sorbinil... Các thuốc nhóm này không có ảnh hưởng trực tiếp trên đường huyết mà chỉ có tác dụng chống lại một số tai biến do ĐTĐ, đặc biệt là các tai biến trên hệ thần kinh.

- Các thuốc uống chống ĐTĐ thuộc nhóm khác: Glymidin, gồm guar, benfluorex, repaglinide, nateglinide...[8].

1.2.2. Nghiên cứu điều trị ĐTĐ bằng thảo dược trên thế giới

Có rất nhiều thực phẩm bổ sung, bao gồm cả thực vật, có thể làm thay đổi nồng độ đường huyết. Ví dụ như việc sử dụng một lượng nhỏ các kim loại như kẽm, vanadi, crom phổ biến cho các bệnh nhân ĐTĐ type 2 [45, 54]. Tuy nhiên, tác dụng của chúng cần được nghiên cứu *invitro*, và các ứng dụng trong điều trị bệnh nhân đôi khi không theo mong muốn. Thật thú vị, một vài nghiên cứu đã cho thấy hoạt tính chống ĐTĐ của thực vật lại liên quan đến thành phần kim loại vi lượng của chúng. Hạt của cây trám mốc hay vối rừng *Eugenia jambolana*, một loài thực vật của Ấn Độ đã được nghiên cứu về hoạt tính của các thành phần vô cơ trên mô hình chuột nhắt. Sau khi đốt cháy hạt thành tro, phần còn lại của hạt cháy có chứa crom, kali, natri và vanadi. Khi cho chuột ĐTĐ uống, các thành phần vô cơ này thể hiện khả năng giúp duy trì nồng độ đường huyết ở mức bình thường [40, 95].

Một số loài thực vật có tác dụng làm hạ đường huyết, trong số đó phải kể đến quế (*Cinnamomum verum* hoặc *C.zeylanicum*, *C.cassia*), hồ lô bá (*Trigonella foenum graecum*), mướp đắng (*Momordica charantia*), dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) và tỏi (*Allium sativum*).

Thí nghiệm cho chuột ĐTĐ type 2 uống dịch chiết từ quế với liều 50 đến 200 mg/kg chuột/ngày trong vòng 6 tuần, kết quả cho thấy đường huyết giảm xuống một cách đáng kể và nồng độ insulin trong huyết tương tăng lên, cholesterol và triglyceride giảm xuống, trong khi đó nồng độ HDLc tăng lên so với lô chuột bình thường. Trong các nghiên cứu trên động vật thí nghiệm, đã xác định được hợp chất trong quế có hoạt tính làm giảm đường huyết là cinnamaldehyde. Dựa trên các xét nghiệm *invitro*, tác dụng của quế lên đường huyết một phần là nhờ sự tăng cường tiết insulin. Các thành phần có hoạt tính khác trong cây quế là các polyme dạng polyphenol của catechin và epicatechin. Các polyme tan trong nước này có chứa hoạt chất chống oxi hóa và tăng cường hoạt tính của insulin. Sự hoạt hóa insulin bởi các thành phần của quế có thể được thực hiện thông qua sự tự phosphoryl hóa các thụ thể của insulin định vị trên bề mặt của tế bào mỡ, do đó hỗ trợ thúc đẩy sự truyền tín hiệu insulin và vận chuyển glucose trong tế bào.

Một loại thảo mộc khác có tác dụng hạ đường huyết là cây hồ lô bá *Trigonella foenum graecum*. Các bệnh nhân ĐTĐ type 1 nếu được uống 100 g bột hạt hồ lô bá hàng ngày (được chia làm hai phần bằng nhau) trong thời gian 10 ngày sẽ có sự giảm đáng kể mức glucose trong máu lúc đói cũng như giảm lượng glucose tổng số được tiết ra trong nước tiểu. Mặc dù không có sự thay đổi về mức HDLc tuy nhiên nồng độ cholesterol, LDLc đều giảm một cách đáng kể. Các bệnh nhân ĐTĐ type 2 được uống 1 g bột hạt hồ lô bá mỗi ngày sau bữa ăn trong sáu tuần, tiếp theo đó là 2g mỗi ngày trong 6 tuần sẽ giúp giảm đáng kể lượng glucose trong máu lúc đói. Một trong các thành phần chính của hạt hồ lô bá có tác dụng giảm đường huyết là 4-hydroxyisoleucine. Dựa trên xét nghiệm chuẩn được thực hiện thường quy tại Mỹ, hợp chất này được nhận thấy là an toàn thậm chí khi sử dụng với liều lượng lớn. Điều này là quan trọng do hồ lô bá được sử dụng với lượng lớn hơn nhiều so với lượng thông thường để điều hòa đường máu [95].

Một thảo mộc khác từ Ấn Độ, cây mướp đắng (*Momordica charantia*, họ Cucurbitaceae) được xác định tại trung tâm y học Ayurvedic - Ấn Độ là có hoạt tính làm giảm đường huyết, nhất là đối với các bệnh nhân ĐTĐ type 2. Mướp đắng còn

được biết với tên *karela*, lê nhựa đắng hay bí đắng. Trong các động vật ĐTĐ thực nghiệm, người ta đã chỉ ra rằng để khôi phục đường huyết về bình thường trong vòng vài tuần, các con chuột cống ĐTĐ được uống mướp đắng với liều khoảng 20 mg/kg trọng lượng cơ thể sẽ có nồng độ đường huyết lúc đói giảm đến 48%. Các cơ chế dự đoán bao gồm sự hấp thụ glucose giảm trong ruột, tăng cường hấp thụ glucose bởi các tế bào cơ xương và sự tái sinh các tế bào beta trong thận để tiết ra insulin. Các nghiên cứu độc học trong động vật không phát hiện thấy có sự thay đổi mô học trong gan và thận cũng như không có sự thay đổi về chức năng của thận và gan, các enzym hóa sinh và các dấu chuẩn khác giữ nguyên không đổi sau khi cho uống cao mướp đắng.

Gymnema sylvestre được gọi là dây thìa canh, một thảo mộc từ Ấn Độ được sự quan tâm trên toàn thế giới khi xét về phổ hỗ trợ kháng ĐTĐ. Các con thỏ ĐTĐ sau khi cho uống dịch chiết dây thìa canh được mô tả hoàn toàn bình thường về cân bằng glucose nội môi, hạn chế sự tăng nồng độ đường huyết cũng như các rối loạn chức năng trao đổi chất. Chữa trị bằng dây thìa canh đã hoạt hóa con đường enzym chuyển hóa glucose bởi tế bào không phụ thuộc vào cơ chế insulin. Nó làm tăng sự chuyển hóa của glucose thành glycogen trong gan và hoạt hóa sử dụng glucose nhờ sự điều khiển khóa hoạt động phosphoryl hóa. Các con chuột cống được cho uống dịch chiết lá dây thìa canh trong vòng 10 ngày trước khi bị tiêm dưới da với beryllium nitrate (một hóa chất gây giảm mức đường máu) và 15 ngày sau khi tiêm không bị suy giảm mức đường máu như các con chuột đối chứng. Các con chuột cống bị tiêm streptozotocin có nồng độ đường huyết tăng đáng kể và thử nghiệm dung nạp glucose bằng đường uống bị bất thường. Tuy nhiên, các con chuột bị tiêm streptozotocin được cho uống dịch chiết nước lá dây thìa canh đã có sự hồi phục đáng kể cân bằng glucose nội sinh, do sự tăng insulin trong máu đã quay trở về mức bình thường trong vòng thời gian 60 ngày điều trị liên tục bằng đường uống. Hiện tượng này là kết quả của sự tái sinh các tế bào beta trong các đảo Langerhans, số lượng các tế bào này tăng gấp đôi so với nhóm đối chứng. Tác giả đã gợi ý rằng cơ chế mà ở đó liệu pháp dùng dây thìa canh khôi phục bình thường sự điều hòa

glucose có thể liên quan đến sự tái sinh của các tế bào beta. Các thành phần hoạt tính hạ đường huyết trong lá *Gymnema sylvestre* đã được xác định là hỗn hợp gymnemic triterpen glycoside acid còn được biết đến như các gymnemoside (a đến f) [96]. Cơ chế hoạt động chính lên sự giảm đường huyết có liên quan đến tác động ức chế sự hấp thu glucose từ ruột non. Dường như các triterpene glycoside từ *Gymnema sylvestre* phát huy hoạt tính giảm lipid thông qua sự ức chế hấp thu chất béo trong ruột. Tác động lên sự ức chế lipid này có thể giải thích một phần do *Gymnema sylvestre* thúc đẩy làm giảm cân [97]. Trong mô hình nuôi chuột cống béo và cho uống dịch chiết lá dây thìa canh trong hai tuần đã suy giảm đáng kể trọng lượng cơ thể khi so sánh với chuột cống thường đối chứng. Cholesterol, LDL, VLDL, và triglyceride đều giảm đáng kể xuống các mức thông thường so với các con chuột cống đối chứng [105]. Hiện nay đã có 70 nghiên cứu trên thế giới về dây thìa canh, được sử dụng rộng rãi tại Ấn độ với tên là DIABETICIN, tại Mỹ với tên SUGAREST, tại Nhật với tên GYMNEMA, Singapore với tên GLUCO CARE.

1.2.3. Nghiên cứu điều trị ĐTDĐ từ nguồn thực vật tại Việt Nam

Hiện nay trên thế giới có nhiều công trình nguyên cứu sản xuất các thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường rất hiệu quả. Ở Việt Nam trong thời gian gần đây cũng có một số nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết của một số thực vật, thảo dược, của các vị thuốc trị bệnh ĐTDĐ, tuy nhiên số công bố chưa thật sự nhiều và mang tính toàn diện. Nguồn thực vật dùng làm dược liệu ở nước ta thật sự dồi dào và đa dạng, có những thực vật vốn rất quen thuộc trong đời sống người dân, được sử dụng làm nước uống hàng ngày [3, 13, 22].

Một số chế phẩm được tiêu thụ trên thị trường dưới dạng thực phẩm chức năng được biết đến như chế phẩm DIABETNA bào chế từ dây thìa canh, dược liệu quý hiếm mới được tìm thấy tại Việt Nam, dựa theo đề tài nghiên cứu của Tiến sỹ Trần Văn Ôn, trường Đại học Dược Hà Nội [25]. Tiến sỹ Đỗ Thị Minh Thìn đã nghiên cứu điều trị ĐTDĐ type 2 bằng chế phẩm từ quả mướp đắng và sinh địa, thử nghiệm lâm sàng chế phẩm dưới dạng bột ADM và chế phẩm cao lỏng Remodin trên 80 bệnh nhân, nhận thấy đường huyết của bệnh nhân giảm xuống một cách có ý

nghĩa, đối với những bệnh nhân trước khi dùng chế phẩm chưa được dùng thuốc đường huyết giảm 42,80% so với trước khi điều trị, còn với những bệnh nhân đã được dùng thuốc trước tỷ lệ giảm đường huyết là 39,04% [32]. Ngoài ra tác giả Phạm Văn Thanh nghiên cứu về thuốc điều trị bệnh đái tháo đường từ quả cây mướp đắng *Momordica charantia* L.. Những kết quả bước đầu đánh giá tác dụng của thuốc mới Morantin liều 0,25g/ngày trên bệnh nhân ĐTĐ type 2, tuần thứ 4 sau khi điều trị đường huyết giảm 40,41% có ý nghĩa thống kê, nói chung đã giảm về gần mức bình thường (đường huyết $7,36 \pm 0,28$ mmol/l). Các tháng tiếp theo điều trị duy trì với liều thấp bằng $\frac{1}{2}$ liều điều trị tích cực, mức đường huyết của người bệnh vẫn giữ được ở mức bình thường. Qua đánh giá bằng các xét nghiệm có liên quan đến chức năng gan, thận, các xét nghiệm về máu thấy rằng các chức năng, thành phần của các cơ quan trên vẫn ổn định bình thường [30].

Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Xuân đã bước đầu nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của Thổ phục linh *Smilax glabra* Roxb. trên chuột nhắt. Kết quả cho thấy mẫu *Smilax glabra* Roxb. (SG) có tác dụng hạ glucose huyết mạnh nhất vào giờ thứ 4 sau khi tiêm màng bụng. Tác dụng của thuốc phụ thuộc vào liều lượng, với liều 100mg/kg mức hạ glucose tối đa là 38%, với liều 200mg/kg mức hạ đường huyết tối đa là 56%. SG với liều 200mg/kg theo đường uống chưa có tác dụng hạ đường huyết.

Nhóm tác giả Phạm Hữu Điền nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của sinh địa *Rehmannia glutinosa* Libosch. và tri mẫu *Anemarrhena asphodeloides* Bunge.. Chế phẩm TĐ-1 có thành phần từ củ sinh địa và thân rễ tri mẫu chiết với ethanol thể hiện tác dụng hạ đường huyết khi dùng tiêm màng bụng cho chuột nhắt trắng với các liều 80mg/kg, 120mg/kg và 160mg/kg. Với liều 120mg/kg tác dụng hạ đường huyết bắt đầu xuất hiện ở giờ thứ 4 sau dùng thuốc (hạ 37%), duy trì ở giờ thứ 8 sau dùng thuốc (hạ 45%) .

Nhóm nghiên cứu của Phùng Thanh Hương đã xác định được tác dụng hạn chế tăng đường huyết của thân mướp đắng trên một số mô hình chuột gây tăng đường huyết thực nghiệm. Sử dụng thân mướp đắng để điều trị sớm và dài ngày

trên mô hình chuột nhất ĐTĐ type 2 cũng có tác dụng duy trì hàm lượng glucose trong máu ở mức tương đối thấp và ổn định. Nhóm nghiên cứu này cũng đã nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* Shum et Thonn. trên chuột nhất trắng thực nghiệm [16, 18].

Nhóm tác giả tại Viện Dinh Dưỡng Việt Nam và Trường Đại học Phụ nữ Nhật Bản đã xác định nụ vôi có hàm lượng polyphenol cao và có khả năng ức chế enzym α -glucosidase. Thử nghiệm về khả năng hạn chế tăng đường huyết sau ăn của nụ vôi trên chuột nhất khỏe mạnh và chuột Wistar ĐTĐ cho thấy lượng đường huyết của nhóm chuột được cho uống bột nụ vôi (500mg/kg cơ thể) giảm một cách có ý nghĩa so với nhóm chuột đối chứng. Ngoài ra nụ vôi còn có khả năng chống oxi hóa, phục hồi hoạt động của một số enzym ở gan (GOT, GST, GSH) [80, 81].

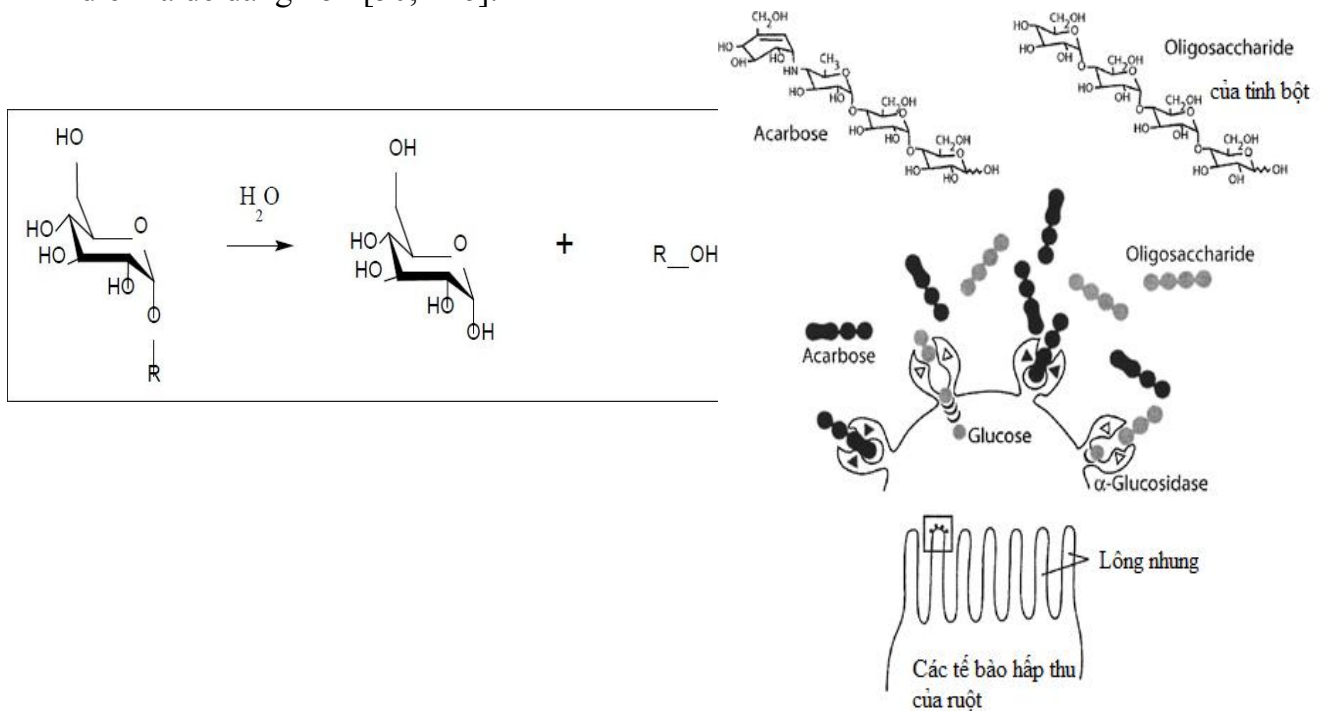
1.3. HOẠT CHẤT CHIẾT XUẤT TỪ THỰC VẬT CÓ KHẢ NĂNG HẠ ĐƯỜNG HUYẾT DO ỨC CHẾ ENZYM α -GLUCOSIDASE

1.3.1. Cơ chế tác dụng của chất gây ức chế enzym α -glucosidase

Hiện nay, các liệu pháp điều trị dành cho bệnh nhân ĐTĐ bao gồm insulin và các loại thuốc uống khác nhau như sulfonylureas, biguanides, chất ức chế enzym α -glucosidase và glinides, các loại thuốc này có thể được dùng đơn lẻ hoặc kết hợp với nhau để hiệu quả hạ đường huyết tốt nhất [71]. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm nghiên cứu về các hợp chất có khả năng ức chế α -glucosidase có nguồn gốc thiên nhiên nhằm bổ sung làm thành phần của thực phẩm chức năng hỗ trợ cho bệnh nhân đái tháo đường. Có rất nhiều chất ức chế α -glucosidase nguồn gốc thực vật, như các flavonoid, alkaloid, terpenoid, anthocyanin, glycoside, hợp chất phenolic... [48].

Cơ chế tác dụng của chất ức chế enzym α -glucosidase điển hình là Acarbose được thể hiện trên Hình 1.4. Sau khi ăn, thức ăn được đẩy qua thực quản vào dạ dày, sau đó tới ruột non. Thức ăn được nghiền nát, bị phân cắt thành các phân tử nhỏ đơn giản hơn nhờ các enzym có trong ruột. Dịch nhầy trong ruột động vật có vú tiết các disaccharidase như maltase, lactase, sucrase [37]. Bình thường sẽ có một màng nằm trong biểu mô ruột non liên kết với enzym giúp cho sự hấp thu glucose

vào ruột non nhờ phản ứng thủy phân cắt các oligosaccharide thành monosaccharide diễn ra dễ dàng hơn [50, 116].



Hình 1.4. Thủy phân oligosaccharide (trái) - Cơ chế cạnh tranh của Acarbose (phải) [116]

α -glucosidase là một carbohydrase loại exo phân bố trong cơ thể vi sinh vật, mô thực vật và động vật, α -glucosidase có trong ruột cũng được hiểu là maltase, nó xúc tác cho phản ứng thủy phân đường maltose thành các đơn phân glucose, làm tăng nồng độ đường huyết. Glucose là một sản phẩm bị phân giải từ carbohydrate, nó ngấm qua thành ruột non và cuối cùng đi vào dòng máu, quá trình này gọi là sự hấp thụ. Sự ức chế enzym này sẽ làm quá trình giải phóng glucose từ các carbohydrate của thức ăn bị chậm lại. Enzym này bị bất hoạt bởi loại thuốc gọi là các chất ức chế α -glucosidase, điển hình là Acarbose. Acarbose là một oligosaccharide có nguồn gốc từ nấm *Actinoplanes*. Acarbose gây ức chế cạnh tranh cơ chất oligosaccharide tinh bột với enzym α -glucosidase, làm giảm quá trình giáng hóa của disaccharide, oligosaccharide và polysaccharide thành monosaccharide là dạng có thể hấp thu được, do đó làm chậm quá trình giải phóng đường glucose cũng như làm chậm lại sự hấp thụ glucose, kết quả nồng độ đường huyết sau ăn sẽ bị giảm xuống giúp ngăn chặn sự tăng đường huyết sau ăn. Ngoài ra Acarbose không

làm tăng insulin huyết, không gây đề kháng insulin, bảo tồn tế bào beta, giảm nồng độ triglyceride và giảm các biến chứng của đái tháo đường [116].

1.3.2. Tổng quan các dịch chiết thực vật và hoạt chất sinh học có khả năng ức chế α -glucosidase

Bảng 1.4 là tổng hợp mới nhất và đầy đủ các thành phần hoạt chất chiết xuất từ những thực vật khác nhau có khả năng ức chế α -glucosidase thể hiện bằng giá trị IC_{50} (nồng độ gây ức chế tối đa 50% hoạt độ của enzym α -glucosidase).

Bảng 1.4: Dịch chiết/hoạt chất chiết xuất từ thực vật có hoạt tính ức chế α -glucosidase

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC_{50}
<i>Acosmium panamense</i> (Onychiuroidea)– Balsamo amarillo [74]	Vỏ cây	Dịch chiết buthanol	109 μ g/mL
<i>Adhatoda vasica</i> Nees (Acanthaceae) – Cang mai [64] *	Lá	Vasicine Vasicinol	125 μ g/mL 250 μ g/mL
<i>Alstonia scholaris</i> (Apocynaceae)–Mồ cua [44] *	Lá	Quercetin3-O- β -D-pylopyranosyl (1 \rightarrow 2'')- β -D- pyranoside (-)-lyoninesinol3-O- β - D- glucopyranoside	1,96 mM (m) 1,95mM (s) 1,43 mM (m)
<i>Bergenia ciliate</i> (Saxifragaceae) – Pakhanbhed [49]	Thân rễ	(-)-3-O-galloylepicatechin (-)-3-O-galloylcatechin	560 μ M (s), 334 μ M (m) 297 μ M (s), 150 μ M (m)
<i>Cassia auriculata</i> – Avartaki [74]	Hoa	Dịch chiết methanol	0,023mg/mL
<i>Cecropia obtusifolia</i> (Cecropiaceae) – Guarumo [74]	Lá	Dịch chiết buthanol	14 μ g/mL
<i>Chinese aloe</i> (Asphodelaceae) – Lô hội Trung Quốc [74]	Lá	Aloeresin A	11,94mM(s) 2,16mM (m)
<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Myrtaceae) – Vối [80] *	Nụ hoa	Dịch chiết nước	ức chế 68,2 \pm 3,4% bởi 100mg

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
<i>Commelina communis</i> (Commelinaceae) – Thài lài [74] *	Phân trên không	Isoquercitrin Isorhamnetin-3-O-rutinoside Isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside Glucoluteolin Chrysoeriol-7-O-β-D-glucoside Orientin Vitexin Isoorientin Isovitexin Swertisin Flavoccommelin 1-Deoxynojirimycin DMDP	2,4x10 ⁻⁴ M 5,1x10 ⁻⁴ M ≥1,0x10 ⁻³ M ≥1,0x10 ⁻³ M ≥1,0x10 ⁻³ M ≥1,0x10 ⁻³ M 4,2x10 ⁻⁴ M ≥1,0x10 ⁻³ M ≥1,0x10 ⁻³ M 3,7x10 ⁻⁴ M ≥1,0x10 ⁻³ M 1,5x10 ⁻⁴ M 5,8x10 ⁻⁵ M
<i>Crataegus oxyacantha</i> (Rosaceae) – Sơn tra [74] *	Lá	Apigenin Vitexin Isovitexin Luteolin Orientin Isoorientin	21,85μM 25,11μM 23,26μM 13,07μM 23,30μM 19,68μM
<i>Curcuma longa</i> - Nghệ [56] *		Demethoxycurcumin Bisdemethoxycurcumin	23,0 μM
<i>Cuscuta reflexa</i> (Convolvulaceae) - Giant dodder [74]		7'-(3',4'-dihydroxyphenyl)-N- [(4methoxyphenyl) ethyl] propenamide 7'-(4'-hydroxy,3'-methoxyphenyl)- N-[(4-butylphenyl)ethyl] propenamide 6,7-dimethoxyl-2H-1-benzopyran-2- one 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 3,5-dihydroxy-7-O-β-D- glucopyranoside-4H-1-benzopyrane- 4-one	103,58μM 45,67μM 0,44mM 0,24mM
<i>Derris indica</i>	Rễ	30,40-dihydroxy-4H-furoyl [2,3-h]-	25,6±0,341 μg/mL

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
(Fabaceae) – Bánh dày [71] *		-chromen-4-one 3,30,40-trihydroxy-4H-furo[2,3-h]- -chromen-4-one Karanjin Pongapin Pongaglabrone Pongamol Ovalitenone Pongachromene Fisetin tetramethyl ether 3-Methoxy-7-hydroxy-30,40- methylenedioxyflavone 7-Omethylchrysin 7,4'-dimethoxy-5-hydroxyflavone Pinnatin Pongapinone-B Piperonylic acid	37,9±2,6µg/mL 26,3±1,8µg/mL 21,4±0,7µg/mL 8,6±0,1 µg/mL 58,2±0,2µg/mL 29,7±0,5µg/mL 22,8±5,5µg/mL 19,7±0,3µg/mL 36±1,8 µg/mL 28,7±1,8µg/mL 4,4±0,1 µg/mL 36,5±5,9µg/mL 1,2±0,2 µg/mL 18,4±2,2µg/mL
<i>Derris scandens</i> (Fabaceae)–Dây tử quy [71] *		Scandenin A Scandenone Scandinone 4,5,7-trihydroxybiprenylisoflavone Dịch chiết chloroform Dịch chiết n-hexane	25,17±0,6µg/mL 34,74±0,6 µg/mL 33,83±1,3 µg/mL 45,14±1,13µg/mL 6,28±1,02 µg/mL 10,63±0,31µg/mL
<i>Dorstenia psilurus</i> (Moraceae) - Đâu nưa [74] *	Rễ	Dorsilurin F Dorsilurin G Dorsilurin H Dorsilurin I Dorsilurin J Dorsilurin K Dorsilurin C	4,13±0,12 µM 7,51±0,17 µM 24,01±0,46 µM 21,49±0,71 µM 16,91±0,68 µM 43,95±0,46 µM 11,17±0,15 µM
<i>Duranta repens</i> (Verbenaceae) – Thanh quan [74] *	Toàn bộ cây	7-O-D-glucopyranosyl-3,5- dihydroxy-3'-(4"-acetoxyl-3"- methylbutyl)-6,4'-dimethoxyflavone 3,7,4'-trihydroxy-3'-(8"-acetoxyl-7"-	65,5±2,5 µM 757,8±65,5 µM

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
		methyloctyl)-5,6-dimethoxyflavone (-)-6β-hydroxy-5β, 8β, 9β, 10α-cleroda-3,13-dien-16,15-olid-18-oic acid	577,7±19,0 μM
<i>Ecklonia stolonifera</i> (Laminariaceae) - Tảo nâu [71] *	Lá	Dịch chiết nước Dịch chiết methanol	0,026mg/mL 0,022mg/mL
<i>Elaeodendron transvaalense</i> (Celastraceae) - Burt Davy [71]	Vỏ thân cây	Dịch chiết aceton	50,62±0,351 μg/ml
<i>Euclea undulata</i> (Ebenaceae) – Guarri lá nhỏ [74]	Vỏ rễ cây	Dịch chiết aceton	49,95±0,007 μg/mL
<i>Fagara tessmannii</i> (Rutaceae) – Uzazi [74]	Vỏ thân cây	Vanillic acid 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone 3β-acetoxy-16β-hydroxybetulinic acid	69,4±0,8 μM 900±3,5 μM 7,6±0,6 μM
<i>Ferula mongolica</i> (Umbelliferae) [74]	Rễ	Baigene A Baigene B Baigene C 7'-Methoxybaigene C Mongolin B 4'-Methoxydshamirone Baigene B Dshamirone Mongolin C Mongolin D	56,06 μM 32,21 μM 63,68 μM 79,87 μM 60,0 μM 82,41 μM 20,5 μM 29,15 μM 4,36 μM 9,31 μM
<i>Grateloupia elliptica</i> (Halymeniaceae) [71]	Tảo	2,4,6-tribromophenol (S) 2,4,6-tribromophenol (B) 2,4-dibromophenol (S) 2,4-dibromophenol (B)	60,3 μM 130,3 μM 110,4 μM 230,3 μM
<i>Gypsophila oldhamiana</i> (Caryophyllaceae) –	Rễ	Segetalic acid 28-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-	23,1±1,8 μM 65,5±4,5 μM

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
Xia-cao (C) hoặc Dae-na-mul (K) [79]		xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-fucopyranosyl ester 3-keto,16α-hydroxy,24-noroleanolic acid	15,2±1,8μM
<i>Hyssopus officinalis</i> (Lamiaceae) – Herb Hyssop [71]	Lá	1-O-beta-D-6'-O-cinnamoylglucopyranosyl-3-(3'',5''-dimethoxyl-4''-hydroxyphenyl)-1,2,3-propanetriol 1-O-beta-D-glucopyranosyl-3-(3'',5''-dimethoxyl-4''-hydroxyphenyl)-1,2,3-propanetriol	3x10 ⁻³ M 3x10 ⁻³ M
<i>Ipomoea balatas</i> (Convolvulaceae) – Khoai lang [74] *	Rễ	Peonidin (m) 6-O-Caffeoylsophorose (s) 6-O-Caffeoylsophorose (m)	200±4,1μM 874±39μM 699±17,1μM
<i>Lobelia chinensis</i> (Campanulaceae) – Bán biên liên [74] *		Radicamines A Radicamines B	6,7x10 ⁻⁶ M 9,3x10 ⁻⁶ M
<i>Machilus philippinensis</i> (Lauraceae) [74]	Lá	Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside 3'',4''-di-E-p-coumaroic acid ester 3''-E,4''-Z-di-p-coumaroic acid ester Quercetin-3-O-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O-rhamnopyranoside	6,1±0,28μM 1,0±0,01μM 33,05±2,68μM 228,11±9,5μM
<i>Malmea depressa</i> (Annonaceae) – Elemuy [71]	Rễ	Dịch chiết buthanol	21μg/mL
<i>Malpighia emarginata</i> (Malpighiaceae) – Cùm rìa [74] *	Quả	Aceronidin (leucocyanidin-3-O-β-D-glucoside)	100μM
<i>Mangifera indica</i> (Malpighiaceae) – Xoài [71] *	Vỏ	Dịch chiết ethanol	314μg/mL
<i>Morus alba</i>	Lá	6-hydroxyapigenin	12μM

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
(Moraceae) – Dâu tằm [74] *		6-hydroxyapigenin-7-O-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyapigenin-7-O-(6-O-feruloyl)-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyluteolin-7-O-(6-O-feruloyl)-β-D-glucopyranoside	≥500μM 300μM ≥500μM ≥500μM
<i>Origanum majorana</i> L. (Lamiaceae) – Kinh giới [71] *	Lá	6-hydroxyapigenin 6-hydroxyapigenin-7-O-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyapigenin-7-O-(6-O-feruloyl)-β-D-glucopyranoside 6-hydroxyluteolin-7-O-(6-O-feruloyl)-β-D-glucopyranoside	12 μM >500 μM >300 μM >500 >500 μM
<i>Penares schulzei</i> – Marine sponge [74]	Vỏ cây	Schulzeines A Schulzeines B Schulzeines C	48-170nM 48-170nM 48-170nM
<i>Pharbitis nil</i> (Convolvulaceae)- Hắc sủu [74] *		Pelargonidin	60μM
<i>Phyllanthus amarus</i> (Phyllanthaceae) - Diệp hạ châu đắng [74] *	Toàn bộ cây	Dịch chiết n-hexane	32μg/mL
<i>Pine</i> (Pinaceae) – Thông [74]	Vỏ cây	Dịch chiết vỏ cây (Pycnogenol)	5μg/mL
<i>Pine needle</i> (Pinaceae) – Thông lá kim [74]	Vỏ cây	Dịch chiết ethanol	155μg/mL
<i>Piper longum</i> (Piperaceae) – Tiêu dài [74] *	Quả	Dịch chiết methanol Pipataline Pellitorine Sesamine	112,9±30,5μg/mL 32,1±0,36μg/mL 34,39±0,97μg/mL 36,39±0,58μg/mL

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
		Brachystamide B Guineensine Deoxynojirimycin	34,09±4,89µg/mL 19,26±1,7µg/mL 12,23±1,41µg/mL
<i>Piper umbellatum</i> (Piperaceae) – Lân hoa gié [71] *	Cành cây	Piperumbellactams A Piperumbellactams B Piperumbellactams C	98,07±0,44µM 43,8±0,56µM 29,64±0,46µM
<i>Psidium guajava</i> (Myrtaceae) - Ôi [71] *	Lá	Dịch chiết nước	60,8±2,1µg/mL
<i>Pteronia divaricata</i> (Compositae) [74]	Toàn bộ cây	Dịch chiết acetone	31,22±0,154µg/mL
<i>Salacia reticulata</i> (Hippocrateaceae) – Kotahla Himbutu [74]	Rễ	Mangiferin (s) Mangiferin (m) (-)-epicatechin (s) (-)-epigallocatechin (s) (-)-4'-O-Methylepigallocatechin (s) Salacinol (s) Kotalanol (s)	87µg/mL >300µg/mL 277µg/mL 130µg/mL >300µg/mL 0,84µg/mL 0,58µg/mL
<i>Scutellaria baicalensis</i> (Lamiaceae) – Hoàng cầm [71] *	Rễ	Baicalein	2,6x10 ⁻⁴ M
<i>Sophora flavescens</i> (Fabaceae) - Khô sâm [71] *	Rễ	Kushenol A (-)-kurarinone Sophoraflavanone G 2'-methoxykurarinone Kurarinol Isoxanthohumol Kurarinidin Maackian	45µM 68µM 37µM 155µM 179µM 358µM 57µM 185µM
<i>Spiraea cantoniensis</i> (Rosaceae) - Thủ cầu [74]	Hoa	Quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)-β-galactoside Kaemferol 3-O-(6-O-caffeoyl)-β-galactoside Kaemferol 3-O-(6-O-caffeoyl)-β-galactoside	0,085mM 0,35mM 0,47mM

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
<i>Syagrus romanzoffiana</i> (Arecaceae) – Queen palm (cọ nữ hoàng) [75]	Hạt	13-hydroxykompasinol A scirpusin C Dịch chiết ethanol có loại chất béo Dịch chiết buthanol Kompasinol A Scirpusin A Pentahydroxystilbene Piceatannol Resveratrol	6,5µM 4,9µM ức chế 55% tại nồng độ 10 µg/mL ức chế 73% tại nồng độ 10 µg/mL 11,2 µM 8,3 µM 19,2 µM 23,2 µM 23,9 µM
<i>Syzygium cumini</i> (Myrtaceae) – Trâm với [71] *	Hạt	Dịch chiết ethanol 70% Dịch chiết acetone Dịch chiết ethylacetate Dịch chiết n-buthanol	24,6±0,7µg/mL 19,5±0,4µg/mL 16,6±0,3µg/mL 8,3±0,2µg/mL
<i>Syzygium malaccense</i> (Myrtaceae) - Điều đỏ [74] *	Vỏ	Casuarine 6-O-β-glucoside	5,7µg/mL
<i>Terminalia chebula</i> – Kha tử [71] *	Hoa	Chebulanin Chebulagic acid Chebulinic acid	690µM 97µM 36µM
<i>Terminalia superb</i> (Combretacea) – Chiêu liêu [71]	Vỏ thân	Gallic acid Methyl gallate Ellagic acid Ellagic acid 3,30-dimethyl ether Ellagic acid-4-o-b-Dxylopyranoside- 3,30-dimethyl ether	5,2±0,2µM 11,5±0,1µM 194,1±0,2µM 184,6±0,9µM 118,7±0,1µM
<i>Tournefortia hartwegiana</i> (Boraginaceae) – Bò cạp [74] *	Phần trên mặt đất	Dịch chiết methanol	3,13mg/mL
<i>Tussilago farfara</i> (Asteraceae) - Khoản đông hoa [63]	Nụ hoa	3,4-Dicaffeoylquinic acid 3,5-Dicaffeoylquinic acid 4,5-Dicaffeoylquinic acid	0,91mM 0,90mM 0,89mM

Thực vật	Bộ phận thu hái	Dịch chiết/Hoạt chất	IC ₅₀
		1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose (chuẩn)	0,14mM
<i>Viburnum dilatatum</i> (Caprifoliaceae) – San đẹp [74]	Quả	Cyanidin 3-sambubioside	3,19mM
		5-Caffeoyl quinic acid	82,18mM
		Cyanidin 3-glucoside	25,55mM
		5-Caffeoyl-4-methoxy quinic acid	11,12mM
		Cyaniding	63,29mM
		Quercetin	29,41mM

Chú thích: (m): Maltase, (s): Sucrase,

DMDP: 2R,3R,4R,5R,5-bis(hydroxymethyl)-3,4-dihydropyrrolidine,

DNJ: 1-deoxynojirimycin,

*: thực vật có ở Việt Nam.

Việc khai thác nguồn tài nguyên thực vật Việt Nam có tác dụng hạ đường huyết là một hướng nghiên cứu hiện rất có tiềm năng phát triển nhằm mục đích hỗ trợ cho bệnh nhân ĐTĐ, tránh được các biến chứng nguy hiểm, bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Nguyên liệu và đối tượng nghiên cứu

- *Nguyên liệu*: 24 đối tượng thực vật Việt Nam (danh sách tại Bảng 2.1). Các mẫu thực vật được thu hái theo mùa, tương ứng với từng bộ phận thu hái khác nhau mà thời điểm thu hái cũng khác nhau, lúc ra hoa, kết trái, phát triển sinh dưỡng như lá, thân... , một số mẫu được mua tại các địa phương.

Bảng 2.1. Các mẫu thực vật được điều tra, nghiên cứu

Stt	Mẫu thực vật	Tên khoa học	Bộ phận thu hái	Nơi thu hái
1	Actisô	<i>Cynara scolymus</i> L.	Hoa	Sa Pa
2	Bàng	<i>Terminalia catappa</i> L.	Lá	Hải Phòng
3	Bầu đất	<i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr.	Thân+lá	Hà Nội
4	Cam thảo đất	<i>Scoparia dulcis</i> L.	Lá	Hải Dương
5	Chó đẻ răng cưa	<i>Phyllanthus urinaria</i> L.	Thân+lá	Bắc Giang
6	Chuối hột	<i>Musa balbisiana</i> Colla	Củ	Hải Dương
7	Cỏ nhọ nồi	<i>Eclipta prostrata</i> (L.)	Thân+lá	Hải Dương
8	Dừa cạn	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Thân+lá	Hà Nội
9	Hương nhu tía	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Lá	Hải Dương
10	Khoai lang tím	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Thịt củ	Nam Định
11	Lô hội	<i>Aloe vera</i> L. (L.) <u>Burm.f.</u> , 1768 (L.) <u>Burm.f.</u> , 1768	Thân lá	Hà Nội
12	Lược vàng	<i>Callisia fragrans</i> (Lindl.) Woodson	Thân+lá	Thanh Hóa
13	Mã đề	<i>Plantago asiatica</i> L.	Thân+lá	Hải Dương
14	Nhàu	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Quả	Huế
15	Ôi	<i>Psidium guajava</i> L.	Vỏ thân	Hà Nội
16	Rau mùi	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Hạt	Hưng Yên
17	Rau muống tía	<i>Ipomoea aquatica</i> Forssk	Thân+lá	Hà Nội
18	Tía tô	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt.	Lá	Hải Dương

Stt	Mẫu thực vật	Tên khoa học	Bộ phận thu hái	Nơi thu hái
19	Tâm gửi trên cây mít	<i>Macrosolen cochinchinensis</i> (Lour.) Blume	Lá	Vĩnh Phúc
20	Vối	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Roxb.) Merr.& Perry	Lá	Bắc Giang
21	Xoài	<i>Mangifera indica</i> L.	Lá	Hải Dương
22	Chè đắng	<i>Ilex kaushue</i> S.Y.Hu	Lá	Cao Bằng
23	Dây thìa canh	<i>Gymnema sylvestre</i> (Retz.) R. Br. ex Schult.	Lá	Quảng Trị
24	Vối	<i>Cleistocalyx operculatus</i> (Roxb.) Merr.& Perry	Nụ	Bắc Giang

Theo tham khảo các mẫu thực vật đã được xác định về hoạt tính hạ đường huyết tại Việt Nam là: lá chè đắng, dây thìa canh, nụ vối ... [21].

Các mẫu được xác định tên khoa học bởi PGS.TS.Trần Ninh, Bộ môn Thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

- **Đối tượng động vật:** chuột nhắt trắng đực dòng Swiss, trọng lượng từ 18–22g, được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương (trong các thí nghiệm của luận án, “chuột” được hiểu là “chuột nhắt”).

2.1.2. Hóa chất và thiết bị thí nghiệm

2.1.2.1. Hóa chất: Tất cả các hóa chất đều đảm bảo độ tin cậy cho thí nghiệm

- Dung môi hữu cơ: n-hexane, methanol, ethanol, ethylacetate, chloroform, n-buthanol,... là các dung môi tinh khiết của Merck, Trung Quốc.

- STZ (streptozotocin) của hãng Sigma.

- Kit ELISA định lượng Insulin của hãng Crystal Chem Inc.

- Kit LabAssayTM Glucose (Mutarotase-GOD Method) của Wako.

- Enzym α -glucosidase chiết tách từ ruột non của chuột (Sigma-Aldrich).

- Silicagel 60 (0,04 – 0,063 mm) của hãng Merck.

- Bản mỏng tráng sẵn pha thường DC-Alufoalien 60 F254 của hãng Merck.

- Hóa chất dùng cho định tính thành phần hóa học flavonoid, alkaloid, tannin, steroid, saponin... của Sigma và Trung Quốc.

- Các hóa chất dùng pha đệm đạt độ tinh khiết: đệm citrate phosphate 0,01M, đệm phosphate pH 6,9, đệm maleate pH 6,9.

2.1.2.2. Thiết bị thí nghiệm

Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu

Stt	Tên thiết bị	Hãng (nước sản xuất)
Thiết bị chiết xuất		
1	Máy cắt quay chân không WB 4000	HEIDOLPH (Đức)
2	Bộ chiết Soxhlet	DURAN-SCHOTT (Đức)
3	Bình chiết mẫu, bình chiết phân đoạn	Đức, Việt Nam, Trung Quốc
4	Tủ sấy, tủ ẩm	MEMMERT (Đức)
5	Tủ hút	OPEP (Đức)
Thiết bị nghiên cứu hoạt tính sinh học		
6	Tủ lạnh, tủ lạnh sâu	SANYO (Nhật)
7	Máy đo đường huyết ONETOUCH	JOHNSON&JOHNSON (Mỹ)
8	Que thử đường huyết ONETOUCH	Trung Quốc
9	Hệ thống phân tích ELISA	BIO-RAD(Mỹ)
10	Máy ly tâm lạnh để bàn SIGMA 3K 30	SIGMA (Đức)
11	Máy đo pH HORIBA F-51BW	HORIBA(Nhật)
12	Cân phân tích	SATORIUS (Đức)
13	Máy đo quang phổ UVmini-1240	SHIMADZU (Nhật)
Thiết bị xác định cấu trúc		
14	Cột sắc ký: các cỡ khác nhau	PHARMACIA (Mỹ)
15	Máy đo quang phổ BIONET-3	BIONET (Mỹ)
16	Máy đo điểm chảy IA 9300	ELECTROTHERMAL (Anh)
17	Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân ADVANCE 500 MHZ	BRUCKER (Đức)

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

2.2.1.1. Xử lý mẫu

Mẫu thu về được loại bỏ phần héo úa, rửa sạch, phơi trong bóng râm cho khô, sấy ở 60⁰C cho đến khi mẫu có khối lượng không đổi, nghiền mẫu thành bột bằng thuyền tán. Bột mẫu được bảo quản trong túi polyetylen, để mẫu nơi khô ráo.

Riêng mẫu lô hội do thân chứa nhiều gel nên rửa sạch, để cho ráo nước, thái lát mỏng sau đó chiết xuất bằng dung môi.

2.2.1.2. Chiết mẫu bằng nước nóng

Bột nguyên liệu được chiết bằng nước nóng 60⁰C theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng bột : thể tích nước) trong thời gian 8 tiếng. Tiến hành lọc nóng, thu được dịch lọc lần 1. Tương tự, phần bã còn lại tiếp tục được chiết với nước nóng 60⁰C theo tỷ lệ 1:7; 1:5 (tính theo nguyên liệu khô ban đầu) thu dịch lọc lần 2, lần 3. Dịch chiết của cả ba lần được gộp lại, cô quay chân không thu cao thô nước nóng tổng số (CNN) .

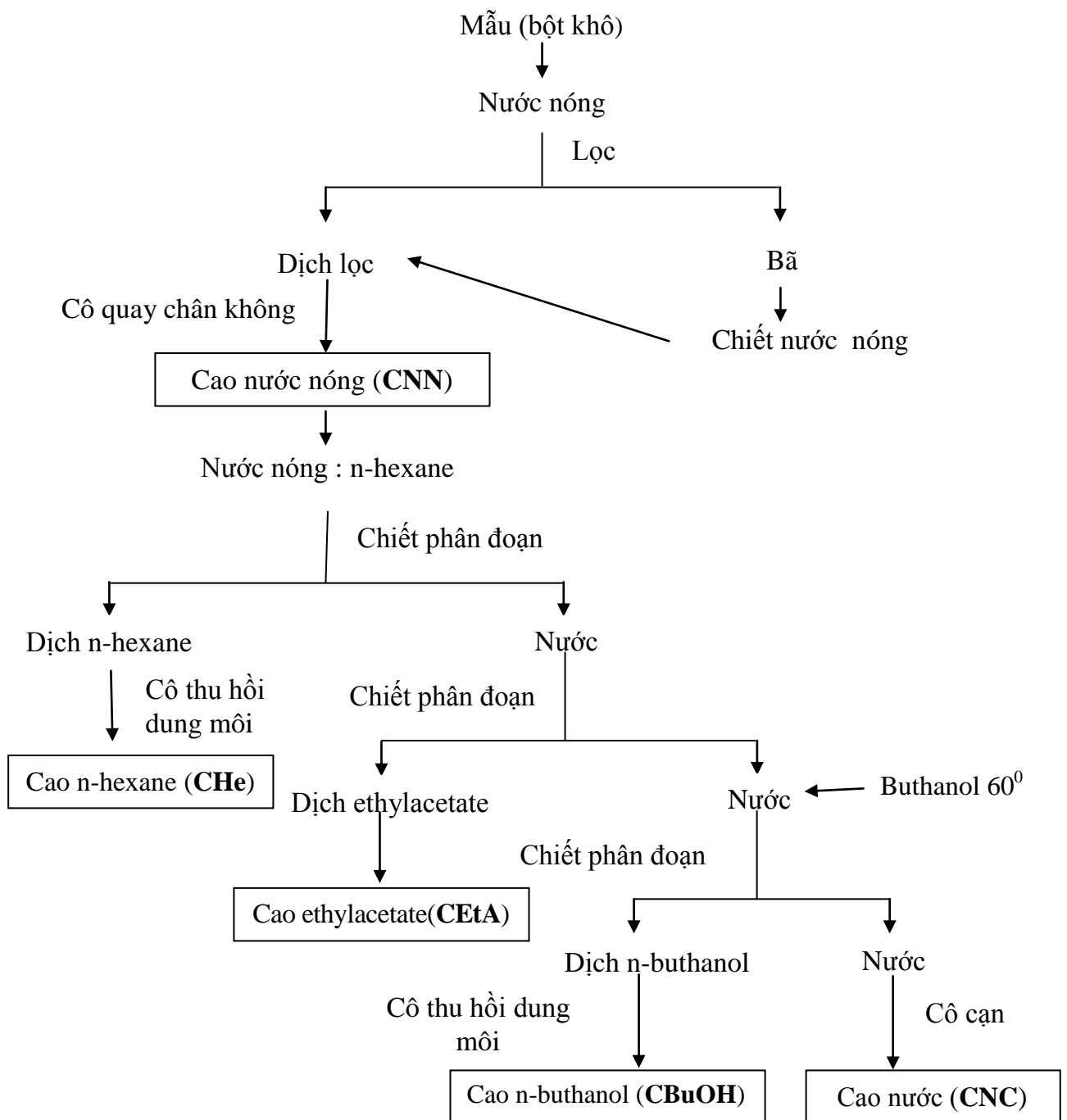
2.2.1.3. Chiết mẫu bằng cồn 60⁰

Mẫu được ngâm trong cồn 60⁰ lần lượt theo các tỷ lệ 1:10; 1:7; 1:5 (khối lượng bột nguyên liệu : thể tích cồn) [85]. Tổng thời gian ngâm chiết là 15 ngày. Tiến hành lọc thu dịch chiết, gộp lại, cô quay chân không thu được cao thô cồn tổng số (CC).

2.2.1.4. Chiết thu phân đoạn trong các dung môi có độ phân cực tăng dần

Từ cao thô nước nóng tổng số tiến hành chiết lần lượt bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexane, ethylacetate, n-butanol [28]. Quy trình tách chiết được trình bày trong hình 2.2. Các dịch chiết được cô quay chân không thu hồi dung môi, thu các cao phân đoạn tương ứng: cao chiết bằng n-hexane: **CHe**, ethylacetate: **CEtA**, n-butanol: **CBuOH**, nước cuối còn lại: **CNC**.

Sơ đồ chiết xuất phân đoạn thể hiện trên Hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn bằng các dung môi hữu cơ

2.2.2. Phương pháp gây chuột nhất ĐTĐ type 2

Hiện có nhiều mô hình gây tăng đường huyết khác nhau trên các đối tượng động vật thực nghiệm như chuột nhắt, chuột cống, thỏ bằng các hóa chất như streptozotocin (STZ), alloxan [39, 100, 112]. Đề tài luận án chúng tôi đã áp dụng mô

hình gây chuột nhất ĐTD type 2: nuôi chuột béo bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp với tiêm STZ với liều 120mg/kg của nhóm tác giả Sawant và tập thể [107].

2.2.2.1. Nuôi chuột nhất béo bằng chế độ ăn giàu chất béo (HFD- high fat diet)

Chuột được mua từ viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, được nuôi ở điều kiện bình thường (12 giờ tối, 12 giờ sáng, nhiệt độ 28 – 30⁰C), trong các lồng riêng để tránh lây chéo xảy ra theo đường hô hấp. Chuột được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn trong 1 tuần đầu để thích nghi với điều kiện môi trường mới. Sau đó được phân thành 2 nhóm là **nhóm ăn thường (ND-normal diet)** được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn (6% chất béo, 20% protein, 60% carbohydrate, 14% các thành phần khác, vitamin và muối khoáng) và nhóm ăn thức ăn giàu chất béo (30% chất béo, 20% protein, 40% carbohydrat, 5% vitamin, các muối khoáng) và bổ sung thóc nảy mầm gọi là **nhóm nuôi béo (HFD-high fat diet)**. Các nhóm chuột được nuôi trong 8 tuần tại Phòng thí nghiệm chuột bạch của Bộ môn Tế bào–Mô phôi-Lý sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Tại thời điểm 0 giờ và 8 tuần, tiến hành cân chuột để theo dõi sự tăng trọng của cơ thể.

2.2.2.2. Gây chuột nhất ĐTD type 2 thực nghiệm

Để tạo chuột ĐTD type 2, các con chuột bị nhịn đói khoảng 12 – 14 giờ, sau đó tiến hành thí nghiệm theo như bố trí trên Bảng 2.3

Bảng 2.3. Bố trí thí nghiệm gây chuột ĐTD type 2

Nhóm chuột	Tiêm hóa chất	Liều tiêm	Kết quả thí nghiệm
HFD	STZ (pha trong đệm citrate 0,01M; pH 4,3)	120mg/kg	HFD+STZ
HFD	đệm citrate 0,01M; pH 4,3	10ml/kg	HFD+đệm
ND	STZ pha trong đệm citrate 0,01M; pH 4,3)	120mg/kg	ND+STZ
ND	đệm citrate 0,01M; pH 4,3	10ml/kg	ND+đệm

Sau khi tiến hành tiêm STZ, các con chuột tiếp tục được nuôi bằng chế độ dinh dưỡng như ban đầu. Đo nồng độ đường huyết lúc đói tại 0 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày. Sau 14 ngày lấy máu định lượng đường huyết và insulin.

2.2.2.3. Định lượng đường huyết

Định lượng đường huyết bằng kỹ thuật enzym, glucose bị oxi hóa nhờ xúc tác của các enzym có trên bề mặt của vùng phản ứng giấy thử và đọc kết quả trên máy One Touch Profile Meter của hãng Johnson&Johnson.

Nguyên lý:

Khi máu tiếp xúc với bề mặt của vùng phản ứng que thử, glucose trong máu sẽ phản ứng với oxi trong không khí nhờ xúc tác của glucooxydase tạo gluconic acid và hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide vừa tạo ra sẽ oxi hóa thuốc nhuộm trên bề mặt vùng phản ứng làm biến đổi màu của giấy thử vùng phản ứng, do oxi hóa O-Dianisidin tạo thành phức chất màu vàng nâu. Máy đo đường huyết sẽ cho kết quả từ 20-600 mg/dl (1,1-33,3 mmol/l).

Tiến hành:

Chuột được nhịn ăn 8 tiếng trước khi đo đường huyết. Dùng tay vuốt nhẹ đuôi chuột theo hướng đến tận cùng đuôi, sát trùng tại vị trí lấy máu, lau sạch lại bằng bông khô. Dùng kim chích máu ở đuôi chuột, bỏ giọt máu đầu, nặn tiếp lấy giọt máu tròn, cắm que thử vào máy, phủ kín giọt máu này lên vùng phản ứng của que thử, sau một vài giây, đọc kết quả trên màn hình của máy thử.

2.2.2.4. Nghiệm pháp dung nạp glucose

Vào ngày thứ 14 sau khi tiêm STZ, mỗi nhóm chọn ra 5 con chuột để nghiên cứu khả năng dung nạp glucose:

Nhóm 1: HFD+STZ

Nhóm 2: HFD+đệm

Nhóm 3: ND+STZ

Nhóm 4: ND+đệm

Chuột bị nhịn đói 12 tiếng trước khi thí nghiệm. Cho tất cả các con chuột uống glucose với liều 5g/kg cân nặng, pha trong dung dịch nồng độ 20%. Định lượng đường huyết tại các thời điểm 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ sau khi cho uống dung dịch glucose [96].

2.2.2.5. Định lượng insulin máu chuột bằng kỹ thuật ELISA

Nguyên tắc: Kỹ thuật miễn dịch liên kết với enzym (ELISA - Enzym Linked Immunosorbent Assay)

Tiến hành: Sử dụng kit Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA

Xử lý số liệu: Từ dãy insulin chuẩn tiến hành đo mật độ quang tại bước sóng 450nm, xây dựng phương trình và đồ thị hồi qui tuyến tính để tìm mối liên quan giữa OD_{450nm} và nồng độ insulin chuẩn. Định lượng nồng độ insulin huyết thanh chuột dựa trên giá trị OD_{450nm} của cơ chất.

Chuột nhắt được xác định ĐTD type 2 (chuột ĐTD type 2) khi có nồng độ glucose cao (xấp xỉ 18 mmol/l) và nồng độ insulin từ 0,5 – 2,0 ng/ml [107].

2.2.3. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết trên chuột nhắt ĐTD type 2

2.2.3.1. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao thô 24 mẫu thực vật trên chuột nhắt ĐTD type 2

Mục đích thí nghiệm: Điều tra khả năng hạ đường huyết trên chuột nhắt ĐTD type 2 của cao thô chiết bằng nước nóng (CNN) và cồn 60⁰C (CC) 24 mẫu thực vật. Từ đây khu trú các mẫu thực vật dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Lô thí nghiệm: Chuột ĐTD type 2 được phân lô (mỗi lô 5 con chuột) để nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của 48 loại cao thô thực vật bao gồm 24 CNN và 24 CC. Thí nghiệm được tiến hành thành 4 đợt.

Tiến hành thí nghiệm: Vào thời điểm 0 giờ trước khi thí nghiệm, tiến hành đo đường huyết chuột ở lô đối chứng và lô thí nghiệm. Lô chuột ĐTD type 2 đối chứng cho uống nước muối sinh lý với liều 10ml/kg. Chuột ĐTD type 2 thí nghiệm được cho uống cao chiết các mẫu thực vật với liều 500mg/kg/ngày vào các buổi sáng hàng ngày. Thí nghiệm được kéo dài trong 20 ngày. Đường huyết chuột được xác định tại các thời điểm 0 giờ, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 20 ngày, lúc chuột đói. Kết thúc thí nghiệm, xác định các mẫu thực vật có tác dụng hạ đường huyết. Thí nghiệm được bố trí theo Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của 24 mẫu thực vật lên chuột nhắt ĐTĐ type 2

Đợt	Lô chuột	Thí nghiệm trên chuột	Đợt	Lô chuột	Thí nghiệm trên chuột
I	1	Lô đối chứng	II	1	Lô đối chứng
	2	CNN hoa actisô		2	CNN lá chó đẻ răng cưa
	3	CC hoa actisô		3	CC lá chó đẻ răng cưa
	4	CNN lá bàng		4	CNN củ chuối hột
	5	CC lá bàng		5	CC củ chuối hột
	6	CNN thân + lá bầu dật		6	CNN tía tô
	7	CC thân + lá bầu dật		7	CC tía tô
	8	CNN lá cam thảo đất		8	CNN cỏ nhọ nồi
	9	CC lá cam thảo đất		9	CC cỏ nhọ nồi
	10	CNN rau muống tía		10	CNN hạt rau mùi
	11	CC rau muống tía		11	CC hạt rau mùi
	12	CNN chè đắng		12	CNN lá xoài
	13	CC chè đắng		13	CC lá xoài
III	1	Lô đối chứng	IV	1	Lô đối chứng
	2	CNN lá dây thìa canh		2	CNN lá mã đề
	3	CC lá dây thìa canh		3	CC lá mã đề
	4	CNN thân + lá dứa cạn		4	CNN quả nhàu
	5	CC thân + lá dứa cạn		5	CC quả nhàu
	6	CNN lá hương nhu tía		6	CNN vỏ thân ổi
	7	CC lá hương nhu tía		7	CC vỏ thân ổi
	8	CNN củ khoai lang tím		8	CNN lá tầm gửi trên cây mít
	9	CC củ khoai lang tím		9	CC lá tầm gửi trên cây mít
	10	CNN lá lô hội		10	CNN nụ vối
	11	CC lá lô hội		11	CC nụ vối
	12	CNN thân + lá lược vàng		12	CNN lá vối
	13	CC thân + lá lược vàng		13	CC lá vối

2.2.3.2. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn mẫu lá vôi, lá chè đắng trên chuột nhắt ĐTĐ type 2

Mục đích thí nghiệm: Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các cao chiết phân đoạn **CHe**, **CEtA**, **CBuOH** các mẫu lá chè đắng, lá vôi. Cho chuột uống cao chiết các phân đoạn với liều tương đương 500 mg/kg/ngày của cao nước [9].

Lô thí nghiệm: Chuột được bố trí lô thí nghiệm theo Bảng 2.5.

Bảng 2.5. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu phân đoạn mẫu lá vôi và lá chè đắng

Lô	Cao chiết cho chuột uống	Lô	Cao chiết cho chuột uống
1	Lô đối chứng	6	CHe lá chè đắng
2	CHe lá vôi	7	CEtA lá chè đắng
3	CEtA lá vôi	8	CBuOH lá chè đắng
4	CBuOH lá vôi	9	CNC lá chè đắng
5	CNC lá vôi		

Tiến hành thí nghiệm: Thí nghiệm được kéo dài trong 20 ngày. Đường huyết chuột lúc đói được đo tại các thời điểm 0 giờ, 7 ngày, 10 ngày và 20 ngày. Chọn lọc các phân đoạn có tác dụng hạ đường huyết tốt trên chuột để xác định thành phần hóa học.

2.2.3.3. Khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhắt ĐTĐ type 2

Từ cao nước nóng tổng số các mẫu thực vật, phối trộn chúng tạo các chế phẩm có thành phần khác nhau nhằm chọn lọc một chế phẩm tác dụng hạ đường huyết tốt nhất, chế phẩm này được đặt tên là **Thivoda**.

Thí nghiệm nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của chế phẩm: cho chuột nhắt ĐTĐ type 2 uống chế phẩm Thivoda liều 500mg/kg chuột/ngày. Đường huyết chuột lúc đói được đo tại các thời điểm 0 giờ, 7 ngày, 10 ngày và 20 ngày.

2.2.4. Xác định chỉ số hóa sinh

2.2.4.1. GOT (glutamate oxalo acetate transaminase)

Tên gọi khác: L-aspartate: 2-oxoglutarate amino transferase (EC 2.6.1.1) [60]

- GOT là enzym có trong mọi tổ chức nhưng nhiều hơn cả là ở cơ tim, gan và cơ xương.

- GOT xúc tác phản ứng: L-glutamate + oxaloacetate \rightleftharpoons L-aspartate + α -ketoglutarate

2.2.4.2. *GPT (glutamate pyruvate transaminase)*

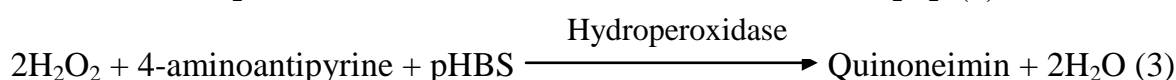
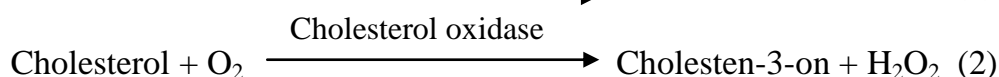
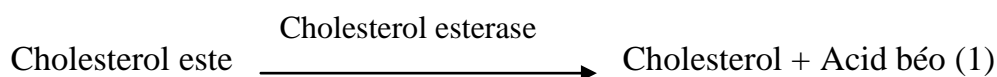
Tên gọi khác: L-alanine : 2-oxoglutarate amino transaminase (EC 2.6.1.2) [39,65]

- GPT xúc tác phản ứng: L-alanine + α -keto glutarate \rightleftharpoons pyruvate + glutamate

2.2.4.3. *Cholesterol*

Tiến hành theo phương pháp của Deeg R. và Zlegenhorn J. trên máy xét nghiệm hóa sinh máu bán tự động [53].

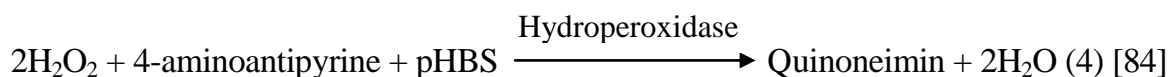
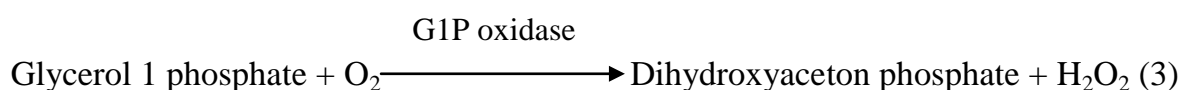
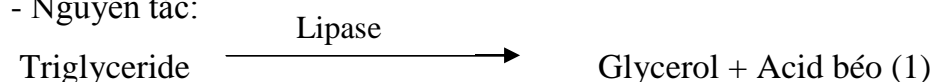
- Nguyên tắc:



Quinoneimin có màu đỏ, độ hấp thụ ở 520nm tỷ lệ với nồng độ cholesterol toàn phần trong mẫu thử.

2.2.4.4. *Triglyceride*

- Nguyên tắc:



2.2.4.5. *HDLc, LDLc*

HDL cholesterol (HDLc) chiếm 18% lipid của HDL, ở người giới hạn HDLc được sử dụng để đối chiếu là mức 35mg/100ml. Khi dưới 35mg thì rủi ro nhồi máu cơ tim xảy ra gấp 7 lần mức trên 35mg và chỉ tiêu HDLc rất có ích cho việc dự phòng các hậu quả của xơ vữa động mạch. LDLc còn gọi là cholesterol xấu, nó là

yếu tố gây xơ vữa động mạch và dễ bị ứ đọng trên bề mặt các mô. Ở người bình thường LDLc = 3,1 – 4,1 mmol/l. Khi tăng trên 4,9 mmol/l là mức cần điều trị [76]. Các xét nghiệm hóa sinh đều được tiến hành tại Trung tâm chẩn đoán Y khoa VIPLAB.

2.2.5. Phương pháp làm tiêu bản đúc cắt gan chuột

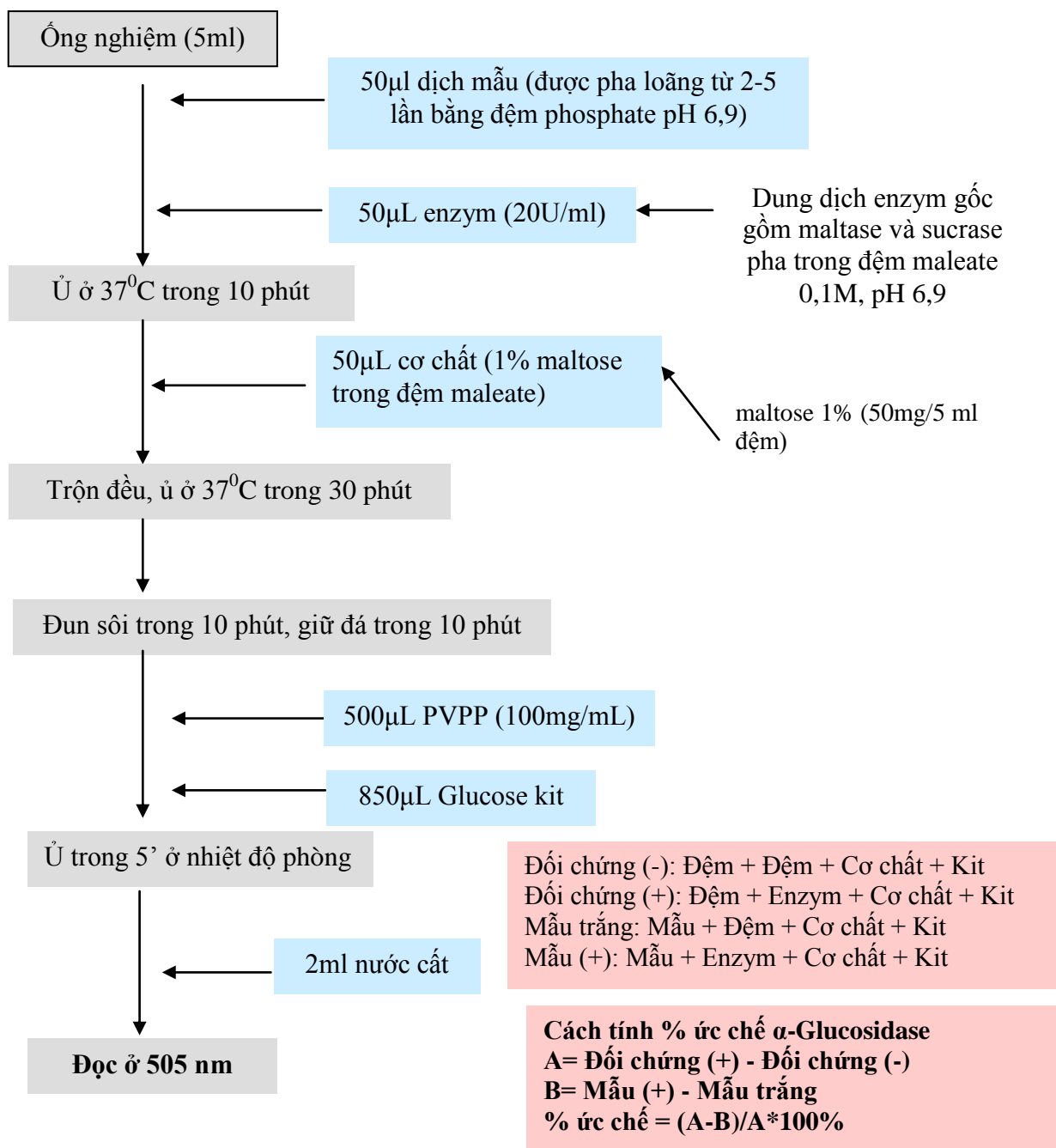
Mẫu sau khi được cố định 12-24 giờ trong dung dịch Boin được rửa dưới vòi nước chảy từ 6-12 giờ để khử chất cố định trong mẫu, sau đó được chuyển qua cồn tăng dần nồng độ 70⁰, 80⁰, 90⁰, 96⁰, 100⁰I, 100⁰II để khử nước, mỗi lọ cồn để mẫu 2 giờ. Tiếp tục cho mẫu qua lần lượt cồn 100⁰ + Toluen với các tỷ lệ 3:1, 1:1, 1:3, Toluen I, Toluen II, mỗi cốc để khoảng 4 giờ để khử cồn và làm trong mẫu. Sau đó cho mẫu lần lượt qua Toluen + Parafin tỷ lệ 3:1, 1:1, 1:3 để trong tủ ấm 37⁰C khoảng 12 giờ để cho mẫu ngấm dần parafin rồi cho Parafin I, Parafin II trong tủ ấm 56-58⁰C trong thời gian 4 giờ.

Mẫu được đúc trong Parafin chứa 3-5% sáp ong và được cắt trên máy cắt microtom quay tay của Mỹ với chiều dày lát cắt là 7 micromet. Các lát cắt được gắn trên lam kính đã được bôi 1 lớp albumin mỏng, sau đó được chuyển tiêu bản vào trong tủ ấm khoảng 12 giờ để cho mẫu gắn chặt vào lam kính.

Nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm kép Hematocilin-Eosin theo trình tự sau: Cho tiêu bản lần lượt qua Toluen I (20 phút), Toluen II (15 phút) để khử Parafin sau đó lần lượt qua cồn + Toluen tỷ lệ 1:1, cồn 100⁰, cồn 90⁰, cồn 80⁰ và cồn 70⁰, mỗi cốc để 5 phút để khử Toluen và ngấm nước vào mẫu. Sau đó rửa tiêu bản qua nước cất rồi cho tiêu bản vào Hematocilin trong thời gian từ 7-10 phút, tráng tiêu bản qua nước cất rồi nhuộm tiếp bằng Eosin trong thời gian khoảng 20 phút. Tráng qua nước cất hoặc chuyển tiêu bản trực tiếp qua cồn tăng dần nồng độ 70⁰, 80⁰, 90⁰, 96⁰, 100⁰I, 100⁰II, mỗi lần 3 phút để khử nước trong tiêu bản. Tiếp tục cho tiêu bản qua cồn + Toluen tỷ lệ 1:1, Toluen I, Toluen II trong 3 phút để khử cồn. Dán Lamelle lên tiêu bản bằng bôm Canada và sau đó chuyển tiêu bản vào trong tủ ấm để bảo quản mẫu. Phân tích tiêu bản và chụp ảnh trên kính hiển vi Olympus. Thí nghiệm thực hiện tại Bộ môn Tế bào- Mô phôi-Lý sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên.

2.2.6. Xác định khả năng ức chế enzym α -glucosidase

Quy trình tiến hành phản ứng thể hiện trên Hình 2.3.

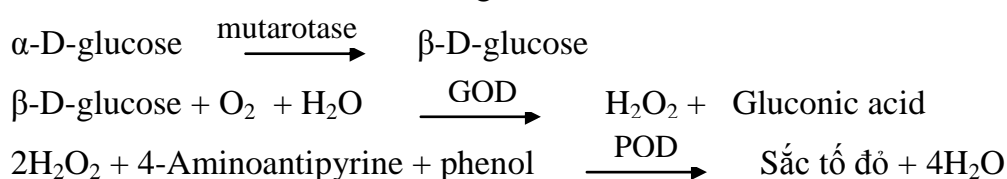


Hình 2.3. Thử nghiệm hoạt tính ức chế α -glucosidase bởi Glucose Kit

α -D-glucose và β -D-glucose trong dung dịch được duy trì cân bằng với một tỷ lệ cố định, glucose oxidase (GOD) chỉ phản ứng với β -D-glucose, mà không phản ứng với α -D-glucose. α -D-glucose phải được chuyển thành β -D-glucose nhờ mutarotase. LabAssayTMGlucose là kit phản ứng định lượng glucose dựa trên

phương pháp enzym với sự kết hợp của mutarotase và glucose oxidase. Khi mẫu (gồm cao chiết thực vật hoặc các chất tinh sạch) được trộn với enzym, cơ chất và chất phản ứng tạo màu, dạng α -D-glucose được chuyển thành β -D-glucose bởi mutarotase. β -D-glucose bị oxi hóa nhờ GOD, qua đó có tạo H_2O_2 . Với sự có mặt của peroxidase (POD), H_2O_2 được định lượng nhờ tạo thành sắc tố màu đỏ do phản ứng oxi hóa kết hợp với 4-Aminoantipyrine và phenol [77].

Dưới đây là sơ đồ phản ứng :



2.2.7. Xác định thành phần hóa học một số mẫu thực vật

2.2.6.1. Khảo sát sơ bộ thành phần hóa học trong một số cao thô thực vật

a. Định tính saponin

- Phản ứng tạo bọt

Pha mẫu thử trong cồn với một lượng thích hợp. Lấy 2 ống nghiệm: ống 1 cho vào 5 ml dung dịch NaOH 0,5N (pH 13), ống 2 cho 5 ml dung dịch HCl 0,1N (pH 1). Sau đó cho vào mỗi ống 5 ml dịch chiết mẫu thử. Lắc mạnh hai ống, nếu thấy có nhiều bọt và bền vững trong môi trường kiềm là có mặt saponin steroid, còn nếu thấy có nhiều bọt và bền vững trong môi trường acid là saponin triterpenoid.

- Phản ứng màu

Lấy vài mg mẫu cho vào ống nghiệm. Sau đó thêm 1 ml anhydric acetic và 1 giọt H_2SO_4 đặc. Kết quả nếu ống nghiệm có màu xanh có chứa saponin steroid, ống có màu đỏ có chứa saponin triterpenoid.

b. Định tính flavonoid

Mẫu thử được pha trong ethanol với một lượng thích hợp để làm các phản ứng:

- Phản ứng Shinoda: Cho mẫu vào 2 ống nghiệm: ống 1 làm đối chứng, ống 2 nhỏ từ từ vài giọt HCl, thêm một chút bột Mg vào, để 1- 2 phút rồi đun nóng. Phản ứng dương tính khi trong ống nghiệm xuất hiện màu đỏ tươi hay màu đỏ cam.

- Phản ứng với dung dịch kiềm NaOH 10%: cho mẫu vào 2 ống nghiệm: một ống làm đối chứng, ống kia cho thêm vài giọt NaOH 10%. Phản ứng cho màu vàng đậm là có mặt flavonoid.

- Phản ứng với dung dịch H₂SO₄ : tương tự như đối với phản ứng NaOH 10%, phản ứng dương tính khi cho màu vàng, đỏ, nâu đỏ.

c. Định tính alkaloid

Mẫu thử được pha trong dung dịch H₂SO₄ 2-5% để làm các phản ứng:

- Phản ứng với thuốc thử Vans-Mayer (HgCl₂ và KI trong nước): alkaloid cho kết tủa trắng hay vàng nhạt.

- Phản ứng với thuốc thử Dragendorff (hỗn hợp Bi(NO₃)₃ và KI trong dung dịch acetic acid): alkaloid cho kết quả màu vàng cam cho đến đỏ.

d. Định tính tanin

- Phản ứng với vanillin: cho dung dịch mẫu vào 2 ống nghiệm, một ống đối chứng còn ống kia thêm vài giọt thuốc thử vanillin/H₂SO₄. Phản ứng dương tính khi có màu đỏ đậm.

- Phản ứng với FeCl₃: mẫu pha còn nhỏ dung dịch FeCl₃ 1% nếu ống nghiệm có màu lục tía, xanh lam đen là dương tính.

e. Định tính steroid: phản ứng Lieberman-Burchard

Hòa tan một lượng mẫu nhất định trong dung dịch chloroform chia làm 2 ống:

+ Ống 1: đối chứng

+ Ống 2: cho 1 ml dung dịch anhydric acetic và 1 ml dung dịch chloroform đã được làm lạnh ở 0⁰C. Thêm một giọt H₂SO₄, kết quả dương tính khi xuất hiện màu xanh, lục, hồng, da cam, đỏ bền.

f. Định tính glycoside: phản ứng Keller-Killian

Dung dịch A: 50 ml dung dịch acetic acid 10% và 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 5%

Dung dịch B: H₂SO₄ đặc và 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 5%.

Lấy 0,01 g căn mẫu thử đã cô cạn cho vào mỗi ống nghiệm. Thêm 1 ml dung dịch A cho hòa tan hết mẫu ống nghiệm và cho từ từ dung dịch B vào. Phản ứng dương tính khi xuất hiện màu nâu đỏ giữa hai lớp chất lỏng [21].

2.2.6.2. Phương pháp phân lập các chất

a. Sắc ký lớp mỏng

Kiểm tra độ tinh khiết của các chất phân lập được bằng sắc ký lớp mỏng. Phương pháp sắc ký lớp mỏng bao gồm pha tĩnh là một lớp mỏng các chất hấp phụ là silicagel. Pha động bao gồm dung dịch cần phân tích được hòa tan trong một dung môi thích hợp và được hút lên bản sắc ký bởi mao dẫn, tách dung dịch thí nghiệm dựa trên tính phân cực của các thành phần trong dung dịch.

Sau khi chạy sắc ký xong phát hiện chất trên bản mỏng bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 368nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ trên bếp điện từ từ đến khi hiện màu.

b. Sắc ký cột

Phân lập hoạt chất từ các phân đoạn có tác dụng hạ đường huyết bằng kỹ thuật sắc ký cột mở pha thường và pha đảo. Nguyên tắc của sắc ký là dựa trên sự phân bố các chất giữa 2 pha: một cố định và một di động. Trong đó, pha tĩnh được nhồi vào một cột thủy tinh, pha lỏng là dung môi dùng để chiết cho chảy qua cột. Mẫu được tách được đưa vào một đầu của cột. Các phần khác nhau của mẫu sẽ đi qua cột với tốc độ khác nhau, các phân tử có kích thước nhỏ sẽ đi sâu vào mạng lưới của chất nhồi, còn các phân tử có kích thước lớn hơn sẽ chỉ thâm nhập ở mức độ nhất định, các phân tử có khối lượng rất lớn sẽ không di chuyển được vào các mao quản. Kết quả là thứ tự các chất ra khỏi cột theo khối lượng phân tử giảm dần [115].

2.2.6.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

a. Điểm nóng chảy (Mp)

Điểm nóng chảy được đo trên máy Kofler micro-hotstage của Viện Hóa học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

b. Phương pháp phổ khối lượng (Mass Spectroscopy)

Kỹ thuật phổ khối lượng được sử dụng khá phổ biến để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ. Nguyên tắc chủ yếu của phương pháp phổ này là dựa vào sự phân mảnh ion của phân tử chất dưới sự bắn phá của chùm ion bên ngoài. Ngoài ion phân tử, phổ MS còn cho các pic ion phân mảnh khác mà dựa vào đó

người ta có thể xác định được cơ chế phân mảnh và dựng lại được cấu trúc hóa học các hợp chất. Chúng tôi sử dụng phương pháp phổ ESI-MS gọi là phổ phun mù điện tử. Phổ này được thực hiện với năng lượng bắn phá thấp hơn nhiều so với phổ EI-MS, do đó phổ thu được chủ yếu là pic ion phân tử và các pic đặc trưng cho sự phá vỡ các liên kết có mức năng lượng thấp, dễ bị phá vỡ.

c. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR- Nuclear Magnetic Resonance)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân là một phương pháp phổ hiện đại và hữu hiệu nhất hiện nay được dùng để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ nói chung và hợp chất thiên nhiên nói riêng.

Nguyên lý chung của các phương pháp phổ NMR (phổ proton và cacbon) là sự cộng hưởng khác nhau của các hạt nhân từ (^1H và ^{13}C) dưới tác dụng của từ trường ngoài. Sự cộng hưởng khác nhau này được biểu diễn bằng độ dịch chuyển hóa học (chemical shift). Ngoài ra, đặc trưng của các phân tử còn được xác định dựa vào tương tác spin các hạt nhân từ với nhau (spin coupling).

- Phổ ^1H -NMR: Trong phổ ^1H -NMR, độ dịch chuyển hóa học (δ) của các proton được xác định trong thang ppm từ 0-14 ppm tùy thuộc vào mức độ lai hóa của nguyên tử cũng như đặc trưng riêng của từng phân tử. Mỗi loại proton cộng hưởng ở một trường khác nhau và vì vậy chúng được biểu diễn bằng một độ dịch chuyển hóa học khác nhau. Dựa vào những đặc trưng của độ dịch chuyển hóa học cũng như tương tác cặp đôi spin mà người ta có thể xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất.

- Phổ ^{13}C -NMR: Phổ này cho tín hiệu vạch phổ của cacbon. Mỗi nguyên tử cacbon sẽ cộng hưởng ở một trường khác nhau và cho một tín hiệu phổ khác nhau. Thang đo cho phổ ^{13}C -NMR cũng được tính bằng ppm và với dải thang đo rộng hơn so với phổ proton (từ 0-240ppm).

- Phổ DEPT: Phổ này cho ta những tín hiệu phổ phân loại các loại cacbon khác nhau. Trên phổ DEPT, tín hiệu của cacbon bậc 4 biến mất. Tín hiệu phổ của CH và CH_3 nằm về một phía và CH_2 về một phía trên phổ DEPT 135. Còn trên phổ DEPT 90 thì chỉ xuất hiện tín hiệu phổ của các CH.

Ngoài ra, người ta còn sử dụng nhiều kỹ thuật phổ 2 chiều rất hiện đại khác, ví dụ như : HMQC, HOMOCOSY, HMBC

+ Phổ HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence): các tương tác trực tiếp H-C được xác định nhờ vào các tương tác trên phổ này. Trên phổ, một trục là phổ $^1\text{H-NMR}$ còn trục kia là $^{13}\text{C-NMR}$. Các tương tác HMQC nằm trên đỉnh các ô vuông trên phổ.

+ Phổ $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY ($^1\text{H-}^1\text{H}$ Chemical Shift Correlation Spectroscopy): phổ này biểu diễn các tương tác H-H, chủ yếu của các proton đính với cacbon liền kề nhau. Chính nhờ phổ này mà các phần của phân tử được nối ghép lại với nhau.

+ Phổ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity): Đây là phổ biểu diễn các tương tác xa của H và C trong phân tử [88, 101].

2.2.8. Bào chế chế phẩm Thivoda

Từ cao nước nóng tổng số các mẫu thực vật, phối trộn chúng tạo các chế phẩm có thành phần khác nhau nhằm chọn lọc một chế phẩm tác dụng hạ đường huyết tốt nhất, chế phẩm này được đặt tên là **Thivoda**. Chế phẩm này bao gồm các thực vật: lá dây thìa canh, lá vòi, nụ vòi, lá chè đắng, thân và lá chó đẻ răng cưa. Các dược liệu được sắc bằng nước dựa theo phương pháp cổ truyền để lấy các chất có tác dụng sinh học. Dem dịch chiết cô đặc thành cao. Cho thêm bột thuốc hay tá dược vừa đủ, làm thành viên nhỏ và làm khô [20, 24, 26].

Chia làm các bước:

a. Chế biến cao: Dụng cụ nấu thường là thùng nhôm, không dùng dụng cụ bằng sắt, giữa lòng thùng có đặt 1 ống để mức nước thuốc ra. Xếp bột thảo dược vào thùng xung quanh ống đã đặt sẵn. Trên mặt dược liệu cần đặt 1 cái vỉ để khi sôi thì dược liệu không nổi lên trên. Cho nước vào ngập dược liệu trên 5 – 10 cm nấu từ 4 – 6 giờ và nấu 2 lần. Sau khi thu dịch chiết cần phải cô đặc với nguyên tắc là cô ở nhiệt độ càng thấp càng tốt và thời gian càng ngắn càng tốt.

Cách cô chế phẩm là dùng chậu nhôm hoặc men, chung cách thủy hoặc đặt vào cát nóng cho thuốc dần cô lại. Nếu chưa sử dụng ngay thì cần bảo quản bằng

cách đổ lên trên bề mặt cao một lớp còn 95⁰, cô đặc thành cao lỏng theo tỷ lệ 1/1 hoặc 2/1.

b. Tạo hạt: Sau khi thu cao của từng loại dược liệu khác nhau sẽ cân với tỷ lệ 1:1:1:1:1 rồi trộn đều. Đun nóng để các cao hòa quyện đều với nhau tạo thành cao tổng, trộn cao lỏng với thuốc bột làm sẵn hoặc tá dược (tinh bột, đường sucrose, glucose, lactose...) theo tỷ lệ qui định thành khối dẻo không dính tay.

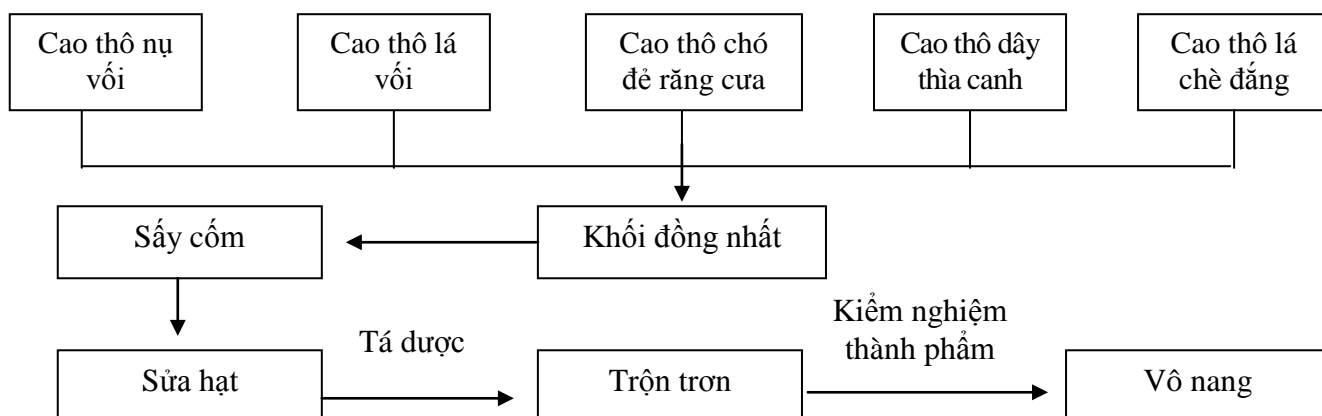
Để kích thước hạt và màu sắc được đồng đều người ta thường chia khối dẻo thành các miếng nhỏ, với độ dày <0,5cm, rộng khoảng 0,5 – 1cm và dài khoảng từ 2 – 3cm. Đem sấy khô ở 60⁰C trong tủ sấy trong vòng 24 giờ để nước bay hơi hoàn toàn. Thu được các miếng nhỏ màu nâu đen, có mùi thơm của dược liệu. Sử dụng thuyền tán hoặc máy nghiền để nghiền nhỏ các cao khô thành hạt.

c. Làm khô: đem các hạt ướt sấy khô ở 60 độ C trong khoảng 8 đến 10 giờ cho đạt độ thủy phân của thuốc chiếu ở mức thấp nhất. Để đảm bảo các hạt tương đối đồng đều, rây lại qua rây số 2000 và 710 để loại hạt to quá hoặc nhỏ quá.

d. Đóng viên

Phân bột mịn thu được sẽ được đóng gói vào các viên nang số 0 nhờ dụng cụ đóng thuốc thủ công tự chế.

Hình 2.4 là sơ đồ thể hiện qui trình bào chế chế phẩm Thivoda



Hình 2.4. Qui trình bào chế chế phẩm Thivoda

Chế phẩm Thivoda được bào chế dưới dạng cốm thành phẩm được đóng nang, nang được sử dụng là nang số 0 được sản xuất tại công ty SUHEUNG CAPSULE (Đồng Nai).

Bảo quản: Chế phẩm Thivoda phải được bảo quản trong các lọ kín, đóng từng liều với số lượng 120 viên/hộp, có nhãn đúng qui định. Để nơi khô mát.

2.2.9. Xác định độc tính cấp của chế phẩm Thivoda

Nguyên tắc: xác định được LD₅₀ - liều gây chết 50% động vật thí nghiệm [19] .

Thí nghiệm được tiến hành tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương.

Động vật thí nghiệm:

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss (18-20g) do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.
- Điều kiện chăm sóc: Động vật thí nghiệm được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột.

Thử sơ bộ:

- Pha hỗn dịch thử có nồng độ khoảng 0,83 g mẫu thử/ml nước cất
- Thăm dò ở mức liều không làm chết chuột thí nghiệm: dùng 5 con chuột, cho mỗi chuột uống 0,4 ml mẫu thử (tương đương mức liều 16,7 g mẫu thử/kg chuột)
- Thăm dò mức liều làm chết 100% số chuột thí nghiệm: dùng 5 con chuột, cho mỗi chuột uống 1,2 ml mẫu thử chia làm 3 lần uống, mỗi lần uống 0,4 ml cách nhau 2 giờ (tương đương mức liều 50,0 g mẫu thử/kg chuột).

Thử nghiệm chính thức:

- Các mức liều thử nghiệm:
 - Mức liều 1: 16,7 g mẫu thử/ kg chuột
 - Mức liều 2: 25 g mẫu thử/ kg chuột
 - Mức liều 3: 33,3 g mẫu thử/ kg chuột
 - Mức liều 4: 41,7 g mẫu thử/ kg chuột
 - Mức liều 5: 50,0 g mẫu thử/ kg chuột
- Cách xử lý và chuẩn bị mẫu thử: pha hỗn dịch thử có nồng độ khoảng 0,83 g mẫu thử/ml nước cất (hỗn dịch thử).

Tiến hành thí nghiệm:

- Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.

- Cách dùng: Đưa mẫu thử nghiệm theo đường uống. Lấy thể tích mẫu thử theo qui định đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.

Chuột được chia thành 05 lô, mỗi lô 10 con. Mỗi lô cho uống mẫu chế phẩm với mức liều tăng dần tương ứng: 16,7; 25,0; 33,3; 41,7; 50,0 g mẫu thử/kg chuột.

Lịch theo dõi: Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của động vật thí nghiệm trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê với sự trợ giúp của phần mềm EXCEL 2003. Biểu diễn số liệu dưới dạng $X_{\text{tb}} \pm SD$, so sánh bằng T- test student. Để so sánh sự khác biệt giữa các thời điểm khác nhau trong cùng một nhóm và giữa các nhóm tại cùng thời điểm, dùng thuật toán ANOVA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi $p > 0,05$ [5, 6, 23].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. CHIẾT XUẤT BẰNG NƯỚC NÓNG VÀ CỒN 60⁰ CÁC MẪU THỰC VẬT

Qua tham khảo các tài liệu, kinh nghiệm dân gian và thực tế của các bệnh nhân ĐTĐ type 2, chúng tôi đã quyết định lựa chọn và thu thập 24 mẫu thực vật gồm các loại rau, thân, lá, quả, nụ, hoa... rất phổ biến và được dùng như thực phẩm, đồ uống quen thuộc tại Việt Nam cũng như một số nước trong khu vực Đông Nam Á, như Trung Quốc, Philippine, Malaysia... được dự đoán có khả năng hạ đường huyết [3, 21, 102]. Kết quả chiết xuất 24 mẫu thực vật thu cao nước nóng (CNN) và cao cồn (CC) được trình bày trên Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Chiết xuất các mẫu thực vật bằng nước nóng và cồn

Stt	Mẫu thực vật	m mẫu khô (g)	m CNN (g)	% tách chiết	m mẫu khô (g)	m CC (g)	% tách chiết
1	Hoa actisô	200	58	29,0	200	32	16,0
2	Lá bàng	180	50	27,8	180	26	14,4
3	Thân+lá bầu đất	230	67	29,1	230	28	12,2
4	Lá cam thảo đất	310	80	25,8	310	43	13,9
5	Lá chè đắng	350	110	31,4	350	44	12,6
6	Thân+lá chó đẻ răng cưa	330	80	24	330	57	17,3
7	Củ chuối hột	265	96	36,2	265	50	18,9
8	Thân+lá cỏ nhọ nồi	310	102	32,9	310	35	11,3
9	Lá dây thìa canh	320	128	40	320	96	30
10	Thân+lá dứa cạn	250	69	27,6	250	27	10,8
11	Lá hương nhu tía	220	52	23,6	220	19	8,6
12	Thịt củ khoai lang tím	250	50	20,0	250	35	14,0
13	Thân+lá lô hội	180	49	27,2	180	18	10,0
14	Thân+lá lược vàng	210	68	32,4	210	20	9,5

Stt	Mẫu thực vật	m mẫu khô (g)	m CNN (g)	% tách chiết	m mẫu khô (g)	m CC (g)	% tách chiết
15	Thân+lá mã đề	205	77	37,6	205	28	13,7
16	Quả nhàu	200	68	34,0	200	28	14,0
17	Vỏ thân ổi	200	48	24,0	200	19	9,5
18	Hạt rau mùi	200	55	27,5	200	22	11,0
19	Thân+lá rau muống tía	220	62	28,2	220	31	14,1
20	Lá tía tô	240	79	32,9	240	26	10,8
21	Lá tâm gửi trên cây mít	260	80	30,8	260	38	14,6
22	Lá vôi	260	50	19,2	260	29	11,2
23	Nụ vôi	200	55	27,5	200	25	12,5
24	Lá xoài	220	66	30,0	220	26	11,8

Chúng tôi sử dụng nước cất và cồn thực phẩm được pha loãng bằng nước cất đến 60 độ. Với các mẫu tươi chúng tôi thu khoảng 4 kg/mẫu, sau khi xử lý sơ bộ mẫu được sấy khô đến khối lượng không đổi, hiệu suất thu mẫu khô dao động trong khoảng từ 9% đến 16,25%. Với các mẫu khô như hoa actisô, nụ vôi, quả nhàu... chúng tôi thu khoảng 400 g/mẫu, sau đó mẫu được sấy ở 60⁰C. Mẫu khô được nghiền bằng thuyên tán thành bột khô, chia thành 2 phần bằng nhau, một phần được chiết xuất bằng nước nóng, một phần được chiết bằng cồn 60 độ. Cao khô thu được bằng cách cô dịch chiết dưới áp suất thấp đến thể chất cao khô (không sử dụng cao lỏng). Đối với các thí nghiệm sau này, chúng tôi qui đổi dựa trên tỷ lệ so với cao khô ban đầu để có được liều theo cao khô (mg/kg). Khi cần sử dụng chúng tôi lấy một lượng theo tính toán và hòa tan cao khô vào dung môi như nước hoặc cồn loãng, tùy theo mục đích sử dụng [9].

Nhận thấy rằng chiết bằng nước nóng có hiệu suất chiết xuất cao hơn sử dụng dung môi cồn. Một số cao nước có hiệu suất tách chiết trên 30% như: lá chè đắng (31,4%), củ chuối hột (36,2%), thân và lá cỏ nhọ nồi (32,9%), lá dây thìa canh

(40%), thân và lá lược vàng (32,4%), thân và lá mã đề (37,6%), quả nhàu (34%), lá tía tô (32,9%), lá tầm gửi trên cây mít (30,8%). Các cao còn có phần trăm tách chiết khá cao, bao gồm: củ chuối hột (18,9%), hoa actisô (16%), lá dây thìa canh (30%), lá tầm gửi trên cây mít (14,6%)... Kết quả chúng tôi thu được 24 cao nước nóng và 24 cao cồn của 24 mẫu thực vật. Trong quá trình tách chiết bằng nước nóng chúng tôi thấy rằng một số mẫu có hiện tượng hồ hóa tinh bột như củ chuối hột, củ khoai lang, lượng cao nước thu được tuy nhiều nhưng chưa thể khẳng định về hoạt tính sinh học.

Đa số 24 đối tượng thực vật này lần đầu tiên được nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết tại Việt Nam, một số mẫu thực vật đã được nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam như dây thìa canh, nụ vôi, lá chè đắng [39, 47]. Điều tra các thực vật với tính kế thừa, không những làm phong phú thêm về khả năng hạ đường huyết của các thực vật này mà còn tìm hiểu về cơ chế tác dụng của các hoạt chất, đồng thời với tính phát huy nhằm tìm được các thực vật khác có tác dụng tốt để bổ sung vào danh sách nguồn thực vật dùng hỗ trợ cho bệnh nhân ĐTĐ.

Sở dĩ hai loại dung môi nước nóng và cồn được chọn để chiết xuất các mẫu thực vật thu cao thô là do chúng hoàn toàn phù hợp với điều kiện chiết xuất:

- Trong dân gian thường dùng phương pháp sắc bằng nước hoặc ngâm các thảo dược trong rượu.
- Khả năng thấm vào nguyên liệu và khuếch tán qua màng tế bào rất tốt.
- Các hoạt chất sinh học nói chung thường dễ dàng hòa tan trong cồn và nước.
- Độc tính đối với người thao tác là tương đối thấp, giá cả và khả năng cung cấp hoàn toàn phù hợp [4].

3.2. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ĐIỀU HÒA ĐƯỜNG HUYẾT CỦA DỊCH CHIẾT THỰC VẬT TRÊN CHUỘT NHẮT ĐTĐ TYPE 2

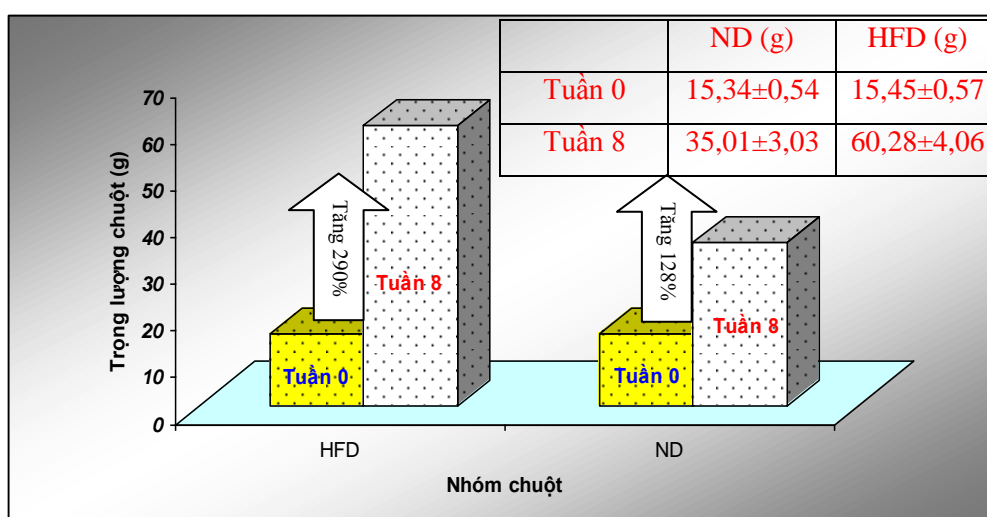
3.2.1. Gây chuột nhắt ĐTĐ type 2

3.2.1.1. Kết quả nuôi chuột nhắt béo

Hiện nay trên thế giới tồn tại hai loại mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng trên đường huyết, đó là mô hình tác dụng của thuốc trên động vật có đường huyết

bình thường và mô hình nghiên cứu tác dụng của thuốc trên động vật đã được gây tăng đường huyết [7]. Để đạt được mục tiêu nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết các mẫu thực vật, chúng tôi đã gây chuột nhất ĐTĐ type 2. Qua tham khảo một số mô hình gây chuột nhất ĐTĐ của các tác giả Nguyễn Ngọc Xuân, Phùng Thanh Hương, Srinivasan K., chúng tôi đã ứng dụng mô hình của Sawant và tập thể, cho chuột nhất ăn thức ăn giàu chất béo trong vòng 8 tuần, sau đó tiêm STZ liều duy nhất 120 mg/kg chuột.

Chúng tôi tiến hành nuôi hai nhóm chuột, mỗi nhóm 25 con: nhóm I cho ăn thức ăn tiêu chuẩn bình thường (ND) và nhóm II cho ăn thức ăn giàu chất béo (HFD). Kết quả sự khác biệt về trọng lượng cơ thể chuột giữa hai nhóm sau 8 tuần nuôi được thể hiện trên Hình 3.1 và Hình 3.2.



Hình 3.1. Sự thay đổi trọng lượng chuột sau 8 tuần nuôi

Nhận thấy, chuột ở nhóm HFD ở tuần thứ 8 có trọng lượng trung bình là 60,28±4,06g đã tăng lên gấp gần 4 lần so với thời điểm trước khi cho ăn béo (15,45±0,57g) và tăng gần gấp đôi so với nhóm ND cùng thời điểm (35,01±3,03g). Trong khi ở nhóm ND, ở tuần thứ 8 trọng lượng trung bình chuột là 35,01±3,03g, tăng gần 2 lần so với thời điểm ban đầu. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) giữa các con chuột trong cùng một nhóm thí nghiệm, giữa nhóm HFD và ND ở tuần thứ 8.



Hình 3.2. Chuột nuôi HFD (bên trái) và chuột nuôi ND (bên phải)

Chúng tôi đã bổ sung thành phần bơ, trứng, lạc, sữa bột vào thức ăn của nhóm HFD, trong vòng 4 tuần đầu nhóm HFD rất thích ăn loại thức ăn béo này, trọng lượng cơ thể tăng nhanh rõ rệt. Tuy nhiên đến tuần thứ 5 sức ăn của chuột giảm, trọng lượng cơ thể tăng rất ít. Chúng tôi đã cho chuột ăn kèm thóc nảy mầm, sức ăn của chúng tăng lên rõ rệt và trọng lượng tăng lên đáng kể, khá đồng đều. Điều này chứng tỏ với thành phần thức ăn giàu chất béo đã làm cho trọng lượng chuột tăng lên một cách có ý nghĩa.

Vào thời điểm tuần thứ 8, chúng tôi chọn ngẫu nhiên ở mỗi lô 5 con chuột, cho nhịn đói 12 giờ, sau đó lấy máu toàn phần (do lượng máu của chuột nhất khá ít) làm xét nghiệm xác định các chỉ số mỡ máu: cholesterol toàn phần, triglyceride, HDLc, LDLc. Kết quả cụ thể được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Sự khác biệt về các chỉ số mỡ máu chuột ở nhóm ND và HFD

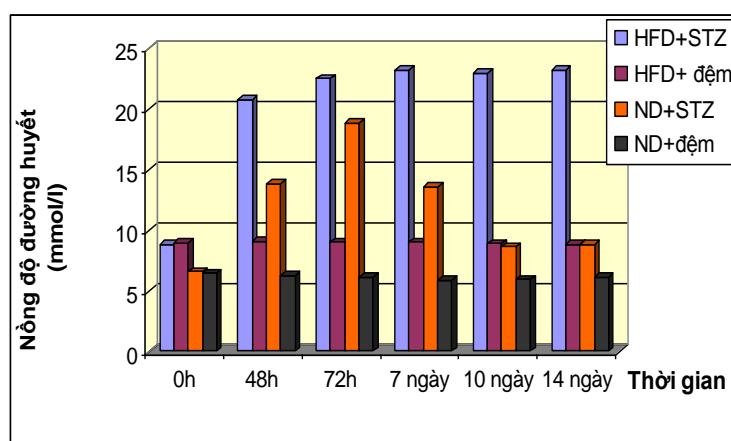
Chỉ số	ND (mmol/l)	HFD (mmol/l)	% tăng (giảm) của HFD so với ND
Cholesterol toàn phần	3,47±0,33	4,52±0,02*	+ 30,3%
Triglyceride	1,17±0,03	2,8±0,31**	+ 139,31%
LDLc	2,13±0,1	2,21±0,2	+ 3,76%
HDLc	1,11±0,1	1,06±0,1	- 4,5%

Ghi chú: *p<0,05; **p<0,001 (so với nhóm ND ở cùng thời điểm)

Trong các chỉ số trên, triglyceride ở 5 cá thể nhóm HFD tăng đáng kể (tăng 139,31%) và có ý nghĩa so với 5 cá thể nhóm ND ($p < 0,001$), điều này có thể được giải thích dựa trên con đường chuyển hóa lipid, dưới tác dụng của lipase dịch tụy lipid bị phân hủy thành acid béo và triglyceride. Tại niêm mạc ruột hầu hết các acid béo và triglyceride được tái tổ hợp lại. Tương tự như vậy, chỉ số cholesterol ở 5 cá thể thuộc nhóm HFD cao hơn so với nhóm ND (hơn 30,3%) và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$. Chế độ ăn khác nhau không làm ảnh hưởng đến hai chỉ số HDLc và LDLc, tuy có sự khác biệt nhưng là hoàn toàn ngẫu nhiên.

3.2.1.2. Nồng độ đường huyết của chuột nhắt béo sau khi tiêm STZ

Kết quả định lượng đường huyết của các nhóm chuột tại các thời điểm 0 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày được trình bày trên Hình 3.3.



Hình 3.3. Nồng độ đường huyết của các lô chuột thí nghiệm tại các thời điểm

Nhìn vào đồ thị trên, thấy rằng có sự khác biệt lớn về nồng độ đường huyết của nhóm chuột HFD+STZ so với ba nhóm còn lại là HFD+đệm, ND+STZ, ND+đệm. Tại thời điểm 0 giờ, các con chuột cho ăn chế độ giàu chất béo HFD có nồng độ đường huyết trung bình ($8,8 \pm 0,36$ mmol/l) cao hơn so với những con cho ăn thức ăn tiêu chuẩn bình thường ($6,57 \pm 0,38$ mmol/l), sự khác nhau này hoàn toàn có ý nghĩa ($p < 0,001$). Hai nhóm không tiêm STZ là HFD+đệm và ND+đệm có đường huyết thay đổi rất ít trong cùng một nhóm tại quãng thời gian thực nghiệm.

Thời điểm 48 giờ sau khi tiêm STZ, nồng độ đường huyết của nhóm chuột HFD+ STZ đã tăng lên đáng kể ($20,83 \pm 0,55$ mmol/l) so với nhóm chuột ND+STZ

(13,88±0,52 mmol/l), $p < 0,001$, chuột HFD+STZ có những biểu hiện bắt đầu bị bệnh ĐTD. Nồng độ đường huyết của nhóm ND+STZ diễn tiến tiếp tục tăng đến 18,89±0,04 mmol/l tại thời điểm 72 giờ, sau đó lại giảm dần ở thời điểm 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày lần lượt như sau: 13,59±0,59; 8,65±0,57; 8,84±0,4 mmol/l. Trong khi đó nhóm chuột HFD+STZ tại các thời điểm này nồng độ đường huyết vẫn rất cao, tương ứng như sau: 22,53±1,12; 23,24±2,29; 22,96±2,47; 23,2±1,86 mmol/l, sự tăng đường huyết ở nhóm này được duy trì khá ổn định, không hề suy giảm. Sự khác nhau hoàn toàn có ý nghĩa với độ tin cậy $p < 0,001$.

Chúng tôi cho rằng: với liều STZ 120mg/kg sau 48 giờ đã làm phá hủy các tế bào beta tuyến tụy, insulin tiết không đủ đáp ứng nhu cầu của cơ thể làm hệ thống điều hòa đường huyết bị rối loạn, glucose tăng cao ở cả nhóm chuột ND+STZ và nhóm HFD+STZ. Nhưng sau đó ở nhóm ND+STZ các tế bào có khả năng được phục hồi và dần tăng tiết insulin, hệ thống thăng bằng đường huyết hoạt động có hiệu quả trở lại, mức đường huyết trở về gần mức bình thường. Trong khi đó nhóm HFD+STZ vẫn có mức đường huyết còn rất cao và duy trì như vậy sau thời gian 14 ngày.

3.2.1.3. Định lượng insulin trong máu chuột nhắt béo tiêm STZ

Tất cả các chuột thuộc 04 nhóm được lấy máu cho vào các ống nghiệm có sẵn chất chống đông EDTA, đem mẫu đi ly tâm lạnh với tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút, hút lấy huyết tương để làm xét nghiệm định lượng insulin bằng phản ứng ELISA.

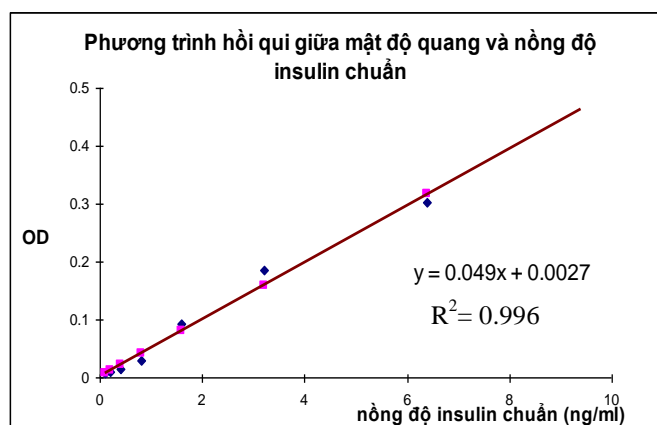
a. Xây dựng đường chuẩn insulin

Đo quang phổ của insulin chuẩn ở các nồng độ tương ứng 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 ng/ml. Bảng 3.3 là kết quả đo mật độ quang của insulin tại bước sóng 450nm, từ đó xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện trên Hình 3.4.

Bảng 3.3. Mật độ quang của insulin chuẩn

Nồng độ insulin chuẩn (ng/ml)	6,4	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1
OD ($\lambda=450\text{nm}$)	0,3025	0,185	0,0935	0,03	0,014	0,009	0,007

Dựa vào những kết quả thu được chúng tôi đã xây dựng phương trình hồi qui tuyến tính giữa mật độ quang và nồng độ insulin chuẩn: $y = 0,049x + 0,0027$ ($R^2=0,996$)

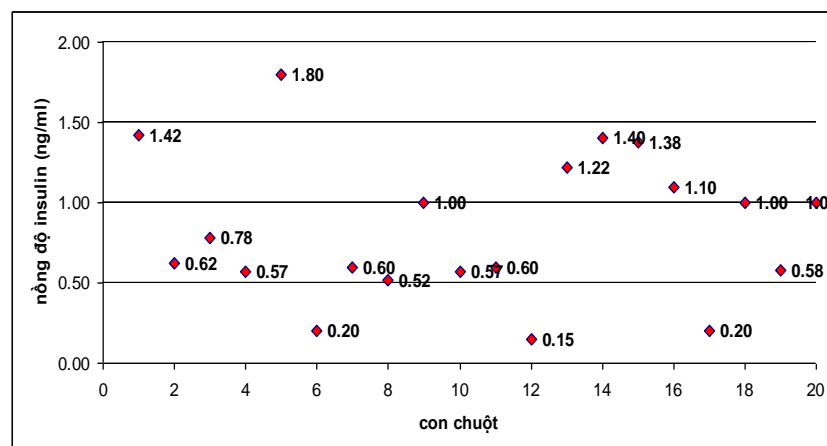


Hình 3.4. Xây dựng phương trình hồi qui tuyến tính

Với phương trình này chúng tôi thấy rằng với độ dốc 0,049 và điểm giao cắt trục tung 0,0027, hệ số tương quan R^2 bằng 1, đường thẳng hồi qui tuyến tính nằm giữa và tương đối sát với các điểm là giá trị OD tương ứng với nồng độ insulin chuẩn (♦), phương trình này là chính xác để chúng tôi ước đoán được nồng độ insulin của chuột nhất gây ĐTĐ type 2 dựa trên những giá trị OD đo được (●) sau khi thực hiện phản ứng ELISA. Trong thực tế hiếm khi có sự liên hệ 100% này mà thường có sự sai lệch giữa trị số quan sát và trị số dự đoán nằm trên đường hồi qui.

b. Kết quả định lượng insulin trong máu chuột nhất HFD+STZ

Thực hiện phản ứng ELISA với bộ kit chuẩn Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA, đo khả năng hấp thụ của cơ chất tại bước sóng A_{450nm} trong 30 phút, dựa vào đồ thị và phương trình hồi qui tuyến tính đã xây dựng ở trên, chúng tôi đã định lượng nồng độ insulin trong máu 20 con chuột HFD + STZ được thể hiện qua Hình 3.5. Các con chuột với nồng độ đường huyết cao (trên 18 mmol/l) và nồng độ insulin nằm trong khoảng 0,5 - 2 ng/ml được coi là chuột ĐTĐ type 2. Nếu xét theo tiêu chuẩn trên, thì chúng tôi đã gây được 17/20 con chuột ĐTĐ type 2, tức hiệu quả đạt 85%. Theo Sawant và tập thể, mô hình gây chuột nhất ĐTĐ type 2 đã đạt hiệu quả 90%, chúng tôi đã ứng dụng thành công mô hình này.



Hình 3.5. Định lượng nồng độ insulin máu chuột HFD + STZ

3.2.1.4. Nghiệm pháp dung nạp glucose

Bên cạnh việc định lượng insulin, khả năng dung nạp glucose là một nghiệm pháp dùng để chẩn đoán bệnh ĐTĐ, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng dung nạp glucose của các nhóm chuột vào thời điểm ngày thứ 14 sau khi tiêm STZ, thu được kết quả trên Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Khả năng dung nạp glucose của các nhóm chuột

Đường huyết Nhóm chuột	0 giờ (mmol/l)	1 giờ (mmol/l)	2 giờ (mmol/l)
HFD + STZ	23,20±1,86	30,04±1,23 ^{I*, II**}	29,95±1,44 ^{I*, II**}
HFD + đậm	8,81±0,34	11,20±1,20	9,25±1,1
ND + STZ	8,84±0,40	12,82±0,87	9,8±0,82
ND + đậm	6,09±0,46	6,33±1,30	6,04±1,12

(Chú thích: n=5, I sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chuột cùng nhóm thời điểm 0 giờ, II sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chuột ở các nhóm đối chứng ở cùng thời điểm, * p<0,05, ** p<0,001)

Sau khi cho các nhóm chuột uống dung dịch glucose với liều 5g/kg cân nặng, đường huyết tăng ở tất cả các nhóm. Khả năng dung nạp glucose của nhóm HFD+STZ giảm so với các nhóm HFD+đậm, ND+STZ, ND+đậm. Tại thời điểm 1 giờ sau khi uống dung dịch đường, đường huyết của tất cả các chuột thuộc 3 nhóm đều tăng lên, tăng nhiều nhất là nhóm ĐTĐ type 2 (30%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 0 giờ (p<0,05), so với các nhóm đối chứng cùng thời

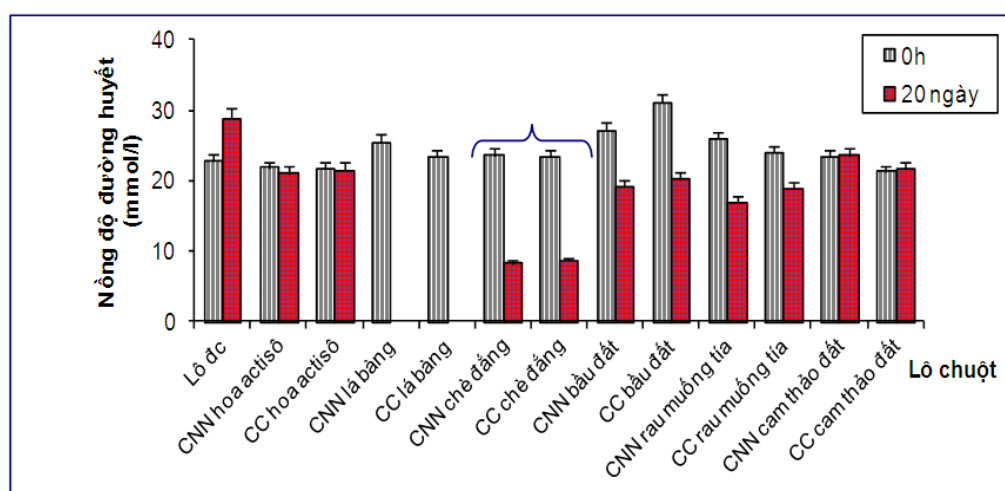
điểm ($p < 0,001$). Tại thời điểm 2 giờ, ba nhóm chuột đối chứng có đường huyết giảm dần về gần mức bình thường, tuy nhiên nhóm chuột ĐTĐ type 2 đường huyết vẫn tăng (p^{I*} , p^{II**}). So với nghiên cứu của Sawant và tập thể thấy rằng đường huyết nhóm chuột ĐTĐ type 2 trong thí nghiệm chúng tôi tại thời điểm 2 giờ là $29,95 \pm 1,44$ mmol/l tương đương $571,5 \pm 25,92$ mg/dl cao hơn nồng độ $25 \pm 4,3$ mmol/l tương đương 450 ± 78 mg/dl.

3.2.2. Sàng lọc các mẫu thực vật có khả năng hạ đường huyết

Dưới đây là kết quả điều tra 24 mẫu thực vật về hoạt tính hạ đường huyết thể hiện dưới dạng biểu đồ, số liệu thống kê chi tiết được trình bày trong phụ lục 2.

3.2.2.1. Đợt I

Sau khi bị gây ĐTĐ type 2 các con chuột được cho uống CNN và CC của 6 mẫu thực vật với liều 500mg/kg/ngày, kết quả thực nghiệm được đánh giá thông qua sự thay đổi nồng độ đường huyết của chuột so sánh với lô đối chứng là chuột ĐTĐ cho uống nước muối sinh lý, thể hiện trên Hình 3.6.



Hình 3.6. Đường huyết của chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt I

Đường huyết chuột được xác định tại các thời điểm: 0 giờ, 3, 7, 10 và 20 ngày, thời gian này dài hơn so với các tác giả khác nghiên cứu tác dụng của chế phẩm trong thời gian tính bằng giờ [7, 17, 36]. Trong số 6 mẫu thực vật được thử nghiệm khả năng hạ đường huyết chỉ có duy nhất mẫu cao lá chè đắng thể hiện hoạt tính tốt nhất: chuột uống CNN đường huyết tại thời điểm ngày thứ 20 hạ 65%, chuột uống CC hạ 64% ($p < 0,001$) so với thời điểm 0 giờ. Cụ thể nồng độ đường huyết của nhóm

chuột ĐTD type 2 cho uống CNN lá chè đắng thời điểm ngày thứ 20 là $8,3 \pm 0,5$ mmol/l, nhóm uống CC lá chè đắng là $8,7 \pm 0,8$ mmol/l. Đường huyết đã giảm tuy chưa thể về mức bình thường (khoảng 6 mmol/l).

Tại Việt Nam, tác dụng hạ đường huyết của chè đắng đã được Viện Y học cổ truyền Quân đội nghiên cứu bào chế viên nang Ilexka chứa cao lá chè đắng và thử nghiệm trên 38 bệnh nhân ĐTD type 2 thể nhẹ và vừa. Sau 30 ngày điều trị đã có 70,1% bệnh nhân đạt kết quả tốt, 21,2% đạt kết quả trung bình và 7,9% đạt kết quả kém [1]. Chúng tôi nhận thấy đây là một thực vật tốt vì không những có khả năng hạ đường huyết mà còn có nhiều tác dụng khác như: hạ huyết áp, hạ cholesterol, chống oxy hóa, chống độc, bảo vệ gan, chống viêm nhiễm...[98, 126].

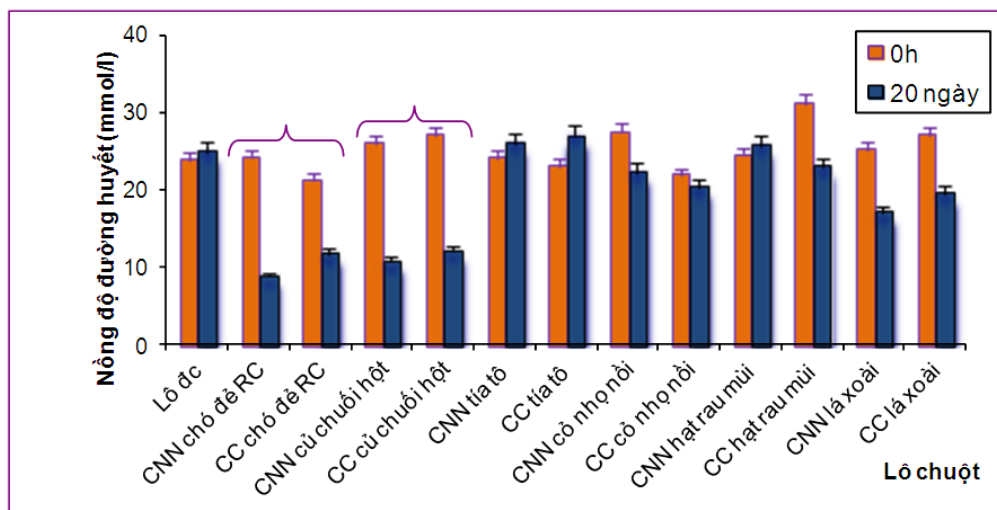
Đối với các mẫu thực vật khác, cao chiết thân lá bầu dặt và rau muống tía thể hiện tác dụng hạ đường huyết nhưng chưa mạnh, chuột sau 20 ngày điều trị có nồng độ đường huyết khá cao, xấp xỉ 20 mmol/l. Đặc biệt lô cho uống cao nước nóng và cao còn lá bàng chuột bị chết tại thời điểm 10 ngày, do chuột bị bệnh và các biến chứng kèm theo nặng nề.

3.2.2.2. Đợt II

Với 6 mẫu nghiên cứu tiếp theo chúng tôi đã phát hiện ra khả năng hạ đường huyết của cao thân và lá chó đẻ răng cưa, chuột uống CNN đường huyết hạ 63%, chuột uống CC hạ 44% ($p < 0,001$) và cao củ chuối hột, chuột uống CNN hạ 58%, chuột uống CC hạ 55% ($p < 0,001$). Tác dụng hạ đường huyết của hai đối tượng thực vật này được chúng tôi đánh giá là tương đối tốt, các con chuột sau khi được điều trị hoàn toàn khỏe mạnh và không xuất hiện các biến chứng của bệnh ĐTD.

Trong dân gian có truyền tụng việc sử dụng củ chuối hột với tác dụng bài sỏi thận hay dùng nhựa từ thân cây để hỗ trợ cho bệnh nhân đái tháo đường, ngoài ra nhóm tác giả Đỗ Quốc Việt đã nghiên cứu sơ bộ tác dụng hạ đường huyết của quả chuối hột trên chuột thực nghiệm, kết quả cho thấy hoạt chất Cyclomusalenon tách chiết bằng cồn với liều tiêm 300mg/kg thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tới 55%. Khi so sánh tác dụng hạ đường huyết bằng đường tiêm màng bụng nhóm nghiên cứu thấy rằng tác dụng của quả chuối hột là tương đương với thân rễ Thổ phục linh

Smilax glabra Roxb. và tốt hơn so với thân rễ Tri mẫu *Anemarrhena asphodeloides* Bunge [36]. Kết quả thử khả năng gây hạ đường huyết thể hiện trên Hình 3.7.



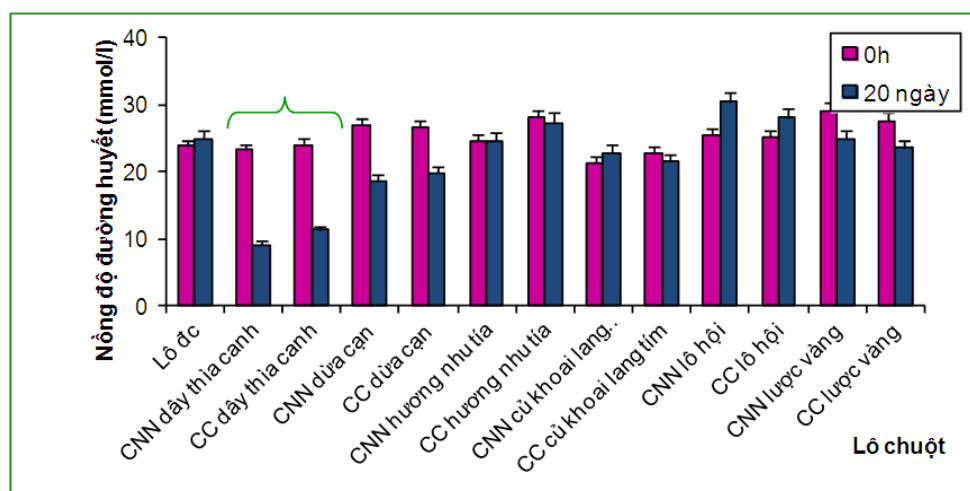
Hình 3.7. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt II

Đây là kết quả đầu tiên tại Việt Nam nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết trên mô hình động vật đái tháo đường thực nghiệm của *Phyllanthus urinaria* L., còn có những tên khác như diệp hạ châu đỏ (tía), diệp hạ châu ngọt, cam kiềm, rút đất ... Với một số loài khác thuộc chi *Phyllanthus* đã có nhiều nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng như thành phần hóa học và tác dụng hạ đường huyết [11,12, 18]. Nhóm tác giả Nguyễn Văn Đậu đã nghiên cứu hoạt chất sinh học từ cây chó đẻ thân xanh *Phyllanthus niruri* L. xác định được các chất: hypophyllanthin, phyllanthin, β -sitosterol đều có khả năng chống oxi hóa khi có phản ứng dương tính với thuốc thử 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) [11]. Nhóm tác giả Phùng Thanh Hương nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* (Schum et Thonn.) trên chuột nhắt trắng thực nghiệm, xác định được liều thích hợp cho tác dụng hạ đường huyết của dịch chiết toàn phần tương đương 15g dược liệu khô/kg [18].

3.2.2.3. Đợt III

Trong đợt III, duy nhất mẫu cao chiết lá dây thìa canh thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất. Chuột uống CNN đường huyết hạ 60%, chuột uống CC hạ 53% ($p < 0,001$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về hoạt tính hạ đường huyết của

dây thìa canh *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult hoàn toàn phù hợp với kết luận của một số tác giả trong và ngoài nước [25, 38, 47]. Hơn nữa các tác giả trên thế giới đã tập trung theo chiều sâu và tương đối đầy đủ cả về hoạt tính sinh học, thành phần hóa học cũng như cơ chế tác dụng của dây thìa canh như ức chế hấp thu glucose qua thành ruột, kích thích tiết insulin đảo tụy của người *invitro* và *invivo* hay khả năng kích thích tăng tiết insulin nhờ tăng tính thấm màng tế bào [41, 90, 97, 113]. Hình 3.8 là kết quả thể hiện khả năng hạ đường huyết của các 6 mẫu TV.

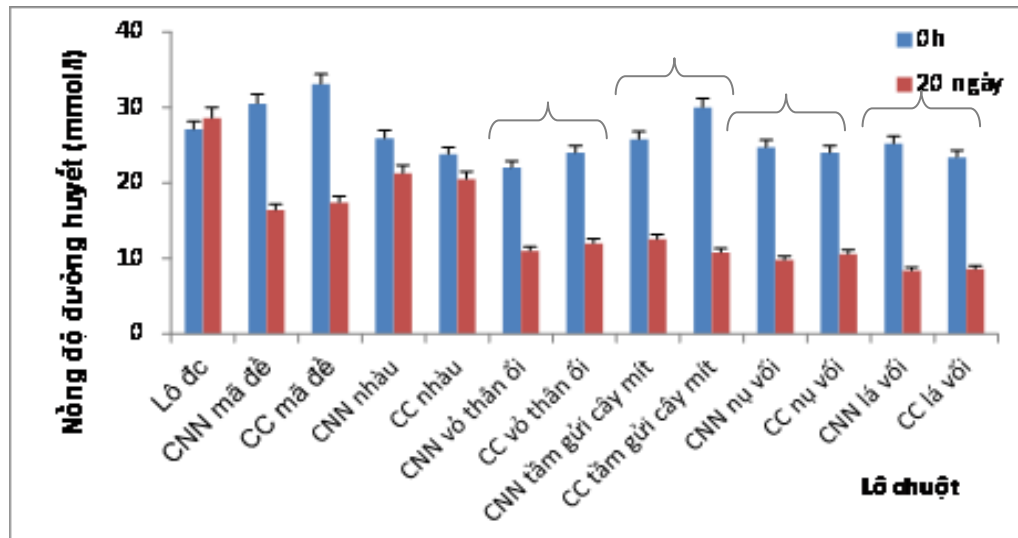


Hình 3.8. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt III

Sở dĩ chúng tôi vẫn chọn mẫu *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult để thử tác dụng hạ đường huyết là do: số lượng các nghiên cứu về đối tượng thực vật này tại Việt Nam còn quá ít ỏi, chúng tôi muốn tiếp tục kế thừa đồng thời ứng dụng và làm phong phú thêm các kết quả về chúng. Mẫu được tìm kiếm và thu hái tại những cồn cát ven biển Quảng Trị, đặc biệt nơi đây có nguồn dây thìa canh mọc tự nhiên vô cùng phong phú. Khác với nhóm tác giả Trần Văn Ôn sử dụng đối tượng chuột bình thường và chuột tăng đường huyết bởi STZ uống dịch chiết trong một thời gian ngắn (tính theo giờ), chúng tôi đã thử nghiệm trên chuột nhất ĐTD type 2, trong 20 ngày và thấy rằng cao chiết dây thìa canh có tác dụng hạ đường huyết ổn định trong một thời gian dài.

3.2.2.4. Đợt IV

Hình 3.8 thể hiện khả năng hạ đường huyết của các 6 mẫu TV đợt cuối cùng.



Hình 3.9. Đường huyết của chuột ĐTD type 2 cho uống cao chiết thực vật đợt IV

Với đợt điều tra cuối cùng này chúng tôi đã thu được 4 mẫu có tác dụng hạ đường huyết tốt nhất là: lá tầm gửi trên cây mít: chuột uống CNN hạ 60%, chuột uống CC hạ 64% ($p < 0,001$). Mẫu nụ vôi: chuột uống CNN hạ 60%, chuột uống CC hạ 56% ($p < 0,001$). Mẫu lá vôi: chuột uống CNN hạ 67%, chuột uống CC hạ 63% ($p < 0,001$). Mẫu vỏ thân ổi: chuột uống CNN hạ 52%, chuột uống CC hạ 48% ($p < 0,001$).

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu nụ vôi dựa trên tìm hiểu những kết quả trong và ngoài nước, đây là một nguồn thực vật vô cùng dồi dào tại nước ta. Nhóm tác giả Trương Tuyết Mai tại trường Đại học Phụ nữ Nhật Bản đã nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết cũng như cơ chế tác dụng của dịch chiết cò và dịch chiết nước nụ vôi, có khả năng ức chế maltase và sucrase của ruột chuột cống. Chuột gây ĐTD bằng STZ sau 8 tuần điều trị bằng dịch chiết lá vôi với liều 500mg/kg/ngày có nồng độ đường huyết giảm rõ rệt so với nhóm chuột ĐTD không được điều trị [80]. Ngoài ra nụ vôi còn được khẳng định có khả năng chống oxy hóa, bảo vệ các tế bào beta của chuột cống ĐTD do STZ [82]. Nhằm làm phong phú thêm về tác dụng của cây vôi, chúng tôi lựa chọn nụ vôi và lá vôi, đặc biệt tập trung nghiên cứu lá vôi vì so với nụ vôi, lá vôi dễ dàng thu hái hơn, hoạt tính hạ đường huyết thể hiện tương đương nụ vôi, các công bố về tác dụng và cơ chế hạ đường huyết còn khá ít ỏi. Sau 20 ngày điều trị nồng độ đường huyết trung bình của nhóm chuột cho uống CNN vỏ thân ổi là $10,5 \pm 2,4$ mmol/l và nhóm chuột cho uống CC

vỏ thân ổi là $12,4 \pm 3,4$ mmol/l. Mẫu ổi *Psidium gajava* Linn. hiện được tập trung nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết của lá và quả. Một lượng lớn các hợp chất tannin, polyphenol, flavonoid, pentacyclic triterpenoid, guajaverin, quercetin và các hợp chất hóa học khác trong lá ổi đã được tác giả Ojewole J.A nghiên cứu về khả năng hạ đường huyết. Dịch chiết nước lá ổi cũng thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase *invitro* [122]. Đối với vỏ thân ổi, những công bố nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết trên thế giới còn rất ít và hiện chưa có tại Việt Nam.

Trong 24 mẫu thực vật được điều tra chúng tôi nhận thấy mẫu lá tầm gửi trên cây mít là đối tượng nghiên cứu hoàn toàn mới, đây là công bố đầu tiên về tác dụng hạ đường huyết của *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Blume trên thế giới cũng như Việt Nam. *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Blume đã được khẳng định có khả năng ức chế virus viêm gan B rất tốt. Gần đây nhất tại Việt Nam TS. Phùng Thanh Hương đã nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lãng nước, cho chuột bị tăng đường huyết uống dịch chiết cón lá bằng lãng nước tương đương 18,2g dược liệu khô/kg chuột, đường huyết hạ từ $18,82 \pm 1,21$ mmol/l xuống $6,17 \pm 1,32$ mmol/l, tương đương với giảm 67,19% [17].

Chúng tôi nhận thấy rằng 8 mẫu thực vật:

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| - Lá chè đắng | - Củ chuối hột |
| - Thân, lá chó đẻ răng cưa | - Lá tầm gửi trên cây mít |
| - Dây thìa canh | - Lá vối |
| - Nụ vối | - Vỏ thân ổi |

trên tổng số 24 mẫu điều tra trong luận án này đã thể hiện hoạt tính hạ đường huyết, mặc dù mức đường huyết sau khi cho uống cao chiết không về đến mức thấp nhưng với mức đường huyết ban đầu của chuột khá cao (thường trên 21 mmol/l, có trường hợp chuột nhất ĐTD type 2 có nồng độ đường huyết 30mmol/l) thì kết quả thu được hoàn toàn hợp lý.

3.3. NGHIÊN CỨU CAO CHIẾT MẪU LÁ VỐI VÀ LÁ CHÈ ĐẮNG

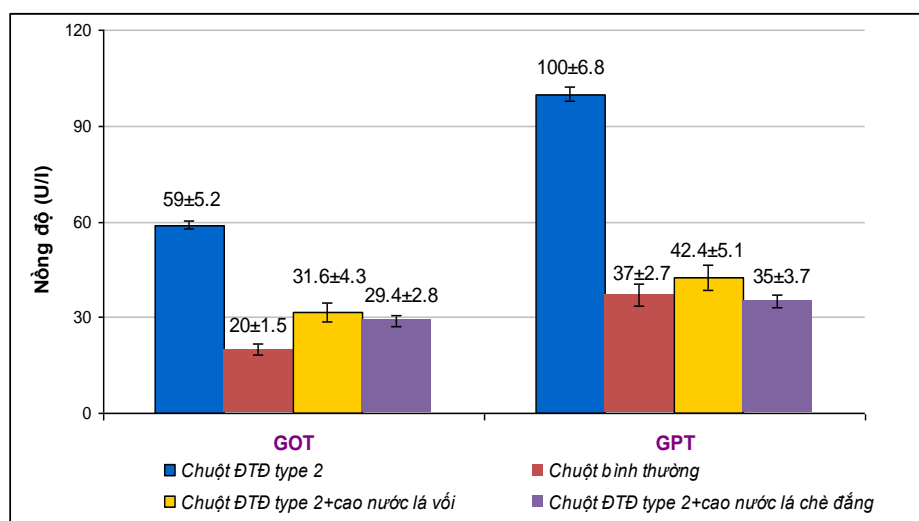
Qua điều tra, mẫu lá vối và lá chè đắng là hai trong số tám mẫu thực vật có hoạt tính hạ đường huyết. Với điều kiện về cơ sở vật chất, tham khảo những kết quả

công bố tại Việt Nam về hai đối tượng này là khá mới, chúng tôi lựa chọn hai mẫu này để nghiên cứu sâu hơn về: (1) Ảnh hưởng lên hình thái tế bào và chức năng gan chuột của cao chiết nước lá vối, lá chè đắng; (2) Tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn; (3) Xác định thành phần hóa học và tinh sạch các hợp chất từ các cao chiết phân đoạn có hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất; (4) Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số cao chiết phân đoạn và hợp chất tinh sạch được.

3.3.1. Ảnh hưởng của cao nước lá vối, lá chè đắng lên hình thái tế bào và chức năng gan chuột

3.3.1.1. Các chỉ số GOT, GPT máu chuột

Bên cạnh nghiên cứu xác định hoạt tính hạ đường huyết của các cao chiết phân đoạn chúng tôi đã theo dõi và xác định các chỉ số men gan, tạo tiêu bản đúc cắt gan chuột. Kết quả thể hiện trên Hình 3.10.



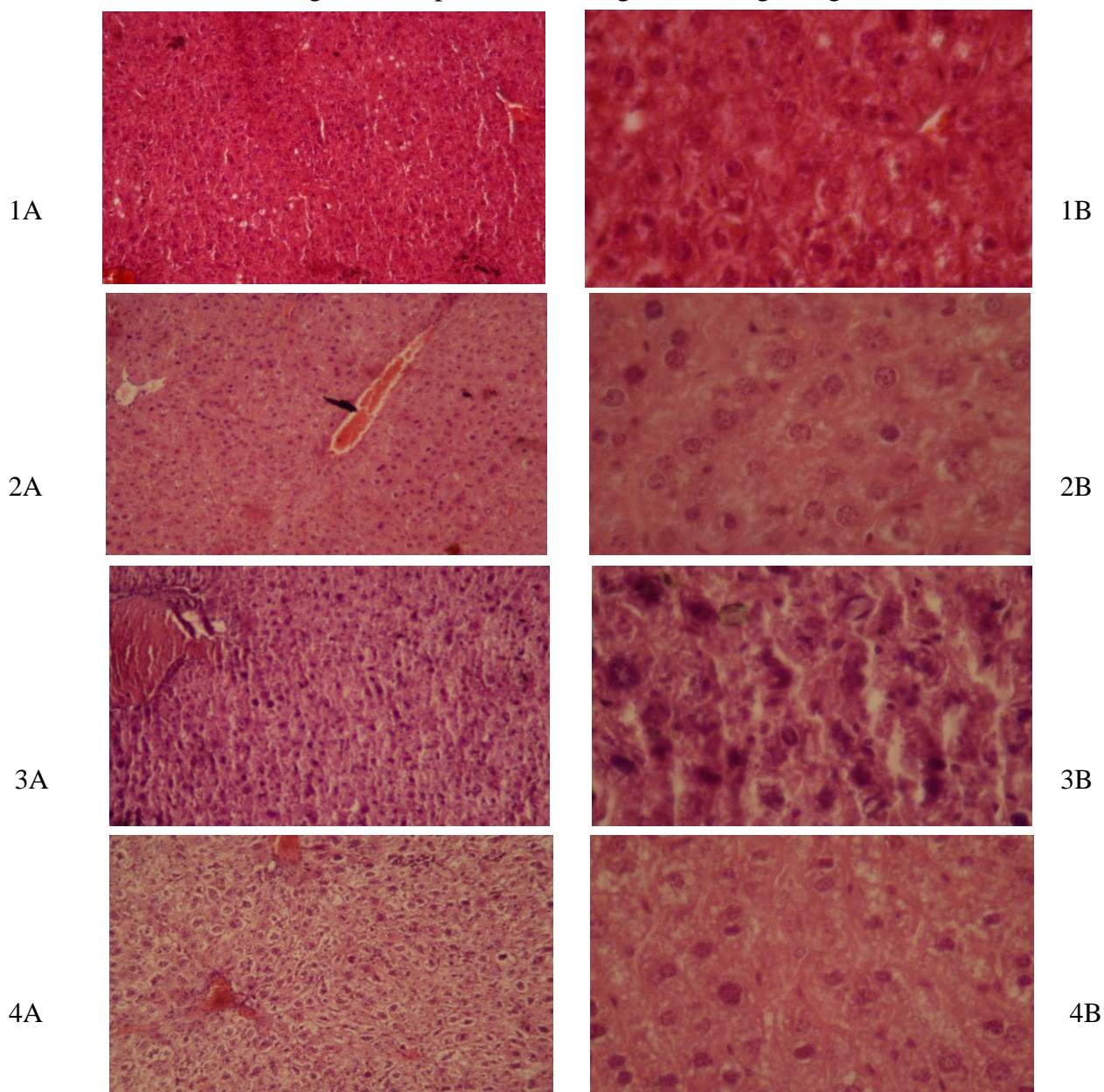
Hình 3.10. Giá trị các chỉ số GOT, GPT trong máu chuột

Chuột ĐTĐ type 2 không cho uống cao chiết lá vối, lá chè đắng có biểu hiện gan bị tổn thương, chỉ số men gan khá cao, chỉ số GOT trung bình là $59\pm 5,2U/l$, GPT trung bình là $100\pm 6,8U/l$. Trong khi đó các con chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao nước lá vối và lá chè đắng các chỉ số men gan đã hạ thấp hơn so với nhóm chuột đối chứng, tuy vẫn cao hơn nhóm chuột bình thường. Nhóm chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao nước lá vối có GOT, GPT trung bình tương ứng là $31,6\pm 4,3$ và $42,4\pm 5,1U/l$, nhóm chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao nước lá chè đắng có GOT, GPT

trung bình tương ứng là $29,4 \pm 2,8$ và $35 \pm 3,7$ U/l, điều này chứng tỏ gan có dấu hiệu được phục hồi.

3.3.1.2. Ảnh hưởng lên cấu trúc mô gan

Hình 3.11 là hình ảnh quan sát tiêu bản đúc cắt gan chuột. Quan sát cấu trúc tế bào học của các mẫu gan nhằm phát hiện những tổn thương trong cấu trúc mô.



Hình 3.11. Hình ảnh quan sát tiêu bản đúc cắt gan chuột

1. Gan chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao nước lá vôi - 2. Gan chuột ĐTĐ type 2 cho uống cao nước lá chè đắng - 3. Gan chuột ĐTĐ type 2 cho uống nước muối sinh lý - 4. Gan chuột bình thường.

A. Chụp ảnh độ phóng đại 400 lần - B. Chụp ảnh độ phóng đại 1600 lần

Tiêu bản gan chuột ĐTĐ type 2 không cho uống cao chiết thực vật các tế bào gan có biểu hiện bị tổn thương, các tế bào méo mó, rời rạc, hình dạng tế bào không rõ rệt, thiếu sự liên kết với nhau, xuất hiện một số tế bào bị teo nhân, kích thước nhỏ hơn so với các tế bào khác. Nhân tế bào bắt màu rất đậm chứng tỏ tế bào đã bị chết (3A và 3B). So sánh với tiêu bản gan chuột ĐTĐ type 2 cho uống CNN lá vối và lá chè đắng, hình ảnh tế bào quan sát nét hơn, dường như không nhận ra sự phá hủy của tế bào, nhân tế bào cũng như các tế bào có kích thước hoàn toàn bình thường và khá đồng đều, nhân tế bào bắt màu hoàn toàn bình thường, đồng thời các tế bào liên kết với nhau (1A, 1B, 2A, 2B), gần như tương đương với tiêu bản gan chuột nhắt bình thường (4A và 4B).

Kết quả quan sát tiêu bản đúc cắt gan chuột đã phản ánh khả năng phục hồi các chỉ số men gan trong gan chuột được cho uống CNN lá vối, lá chè đắng mà chúng tôi đã nghiên cứu trên đây, và mang ý nghĩa khoa học rất lớn khi hai loài thực vật này không chỉ có khả năng hạ đường huyết mà còn thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ gan. Theo các công bố của một số nhà khoa học nước ngoài, trong cao nước lá vối và lá chè đắng có thành phần các hoạt chất chống oxy hóa như các hợp chất flavonoid, carotenoid, polyphenolic...do đó ngoài tác dụng hạ đường huyết chúng còn giúp hồi phục gan bị tổn thương [1, 81, 119].

3.3.2. Cao chiết phân đoạn lá vối

Nhóm tác giả Đào Thị Thanh Hiền đã nghiên cứu một số tác dụng của lá cây vối về: khả năng kháng khuẩn (vi khuẩn *E.coli*), lợi mật, cả tinh dầu vối và cao khô toàn phần đều có khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư gan, màng tim, tử cung [14]. Với các nghiên cứu trên thế giới, đối tượng vối được nghiên cứu tập trung trên nụ vối về hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm nhiễm, kháng vi sinh vật cũng như nghiên cứu về thành phần tinh dầu, các hợp chất flavonoid, terpenoid, chalcone, trong khi đó các công bố về lá vối còn khá ít [35, 57, 58, 86, 111].

3.3.2.1. Khối lượng cao chiết phân đoạn lá vối

Tách chiết theo qui trình Hình 2.1, chúng tôi sử dụng 3kg bột khô lá vối, chiết bằng nước nóng 3 lần, thu được CNN, sau đó tách chiết phân đoạn thu các cao phân

đoạn **CHe**, **CEtA**, **CBuOH**, còn lại những chất không tan trong các dung môi trên nằm trong phân đoạn **CNC**. Sở dĩ chúng tôi dùng nước để chiết cao tổng số là do cao nước và cao cồn của các thực vật nghiên cứu đều có khả năng hạ đường huyết tương tự nhau. Kết quả tách chiết được trình bày trên Bảng 3.5, từ khối lượng cao phân đoạn chúng tôi tính được phần trăm tách chiết là tỷ lệ cao phân đoạn so với cao nước nóng tổng số. Trong các phân đoạn lá vối thu được **CNC** chiếm tỷ lệ lớn nhất (31%), sau đó là **CBuOH** (26,6%), **CEtA** (22%) và ít nhất là **CHe** (13,3%).

Bảng 3.5. Phần trăm tách chiết thu cao phân đoạn lá vối

	Bột khô	CNN	CHe	CEtA	CBuOH	CNC
Khối lượng (g)	3000	600	80	132	160	186
Phần trăm tách chiết (%)	---	---	13,3	22	26,6	31

Các chất không phân cực chiếm tỷ lệ khá ít so với nhóm chất phân cực trung bình và phân cực mạnh. Tuy nhiên để nghiên cứu về hoạt tính hạ đường huyết của các phân đoạn chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm cho chuột nhắt ĐTD type 2 uống cao chiết các phân đoạn.

3.3.2.2. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các cao chiết phân đoạn lá vối

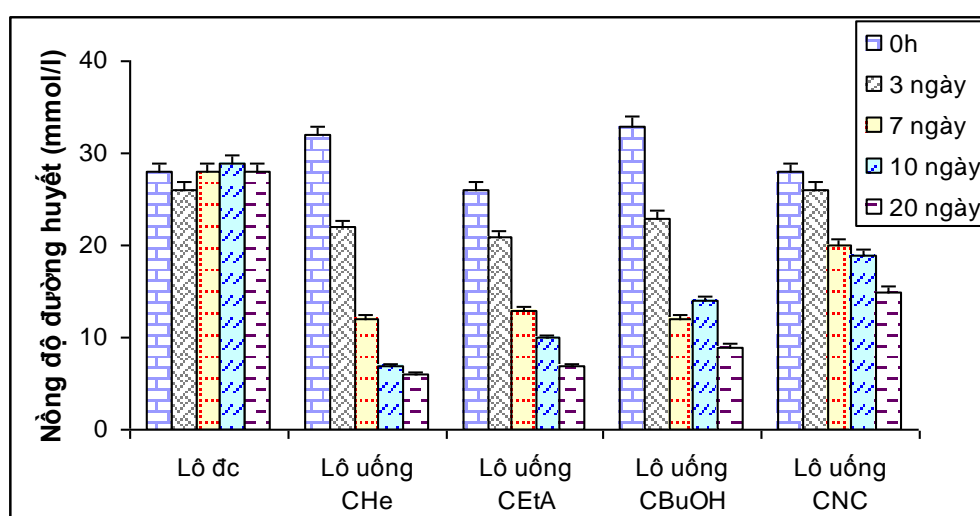
Chuột cho uống cao chiết phân đoạn lá vối với liều 500 mg/kg. Nồng độ đường huyết của chuột ĐTD type 2 được đo tại các thời điểm thí nghiệm là 0 giờ, 3, 7, 10 và 20 ngày. Kết quả được trình bày trên Bảng 3.6 và Hình 3.13.

Bảng 3.6. Nồng độ đường huyết chuột ĐTD type 2 sau khi uống cao chiết phân đoạn lá vối

Stt	Lô	Nồng độ đường huyết của chuột Xtb±SD (mmol/l)				
		0 giờ	3 ngày	7 ngày	10 ngày	20 ngày
1	Lô đ/c	27,9±2,3	26,2±1,9	28,1±2,7	29,3±1,5	28,5±2,1
2	CHe	31,8±3,2	22,1±2,5*	11,2±1,6**	7,1±1,1***	6,1±0,7***
3	CEtA	26,5±2,5	20,7±1,3*	13,4±1,1**	9,5±1,6**	6,8±1,1***
4	CBuOH	33,2±1,4	23,2±1,8*	11,9±1,5**	13,4±1,5**	9,3±1,7***
5	CNC	28,4±2,1	25,7±1,6*	20,3±1,4*	18,8±1,2*	15,2±1,3**

(Xtb là giá trị trung bình của 10 chuột, SD: độ lệch chuẩn, * p>0,05; ** p<0,05; *** p<0,01, p so với lô đối chứng ở cùng thời điểm)

Trước thời điểm 7 ngày, nồng độ đường huyết của các lô chuột được cho uống các cao chiết phân đoạn lá vối tuy có sự khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Bắt đầu tới thời điểm 7 ngày, một số cao chiết lá vối thể hiện hoạt tính hạ đường huyết khá rõ như **CHe**, **CEtA** và **CBuOH** ($p<0,05$). Hoạt tính thể hiện rõ ràng tại thời điểm 20 ngày ($p<0,01$). Sở dĩ chúng tôi kéo dài thời gian thí nghiệm trong 20 ngày để xác định độ ổn định về hoạt tính hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn lá vối.



Hình 3.12. Tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn lá vối

Đối với mẫu lá vối: **CHe** tuy chiếm tỷ lệ thấp nhất nhưng hoạt tính hạ đường huyết lại tốt, nồng độ đường huyết trung bình của chuột sau 20 ngày cho uống **CHe** $6,1\pm 0,7$ mmol/l, tiếp theo là **CEtA** ($6,8\pm 1,1$ mmol/l) và **CBuOH** ($9,3\pm 1,7$ mmol/l). **CNC** cũng có tác dụng hạ đường huyết tuy rằng chưa thật sự hiệu quả (nồng độ đường huyết sau 20 ngày điều trị bằng $15,2\pm 1,3$ mmol/l). Như vậy có thể khẳng định **CHe**, **CEtA** có tác dụng hạ đường huyết tốt nhất, tiếp đó là phân đoạn **CBuOH**.

3.3.2.3. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các cao phân đoạn

Phân đoạn n-hexane có khả năng ức chế enzym α -glucosidase tốt nhất với IC_{50} là $5,037\pm 0,6$ μ g/ml, đồng nghĩa với lượng đường glucose bị hạn chế tạo ra nhiều nhất nên nồng độ đường huyết giảm tốt nhất.

Phân đoạn ethylacetate cũng có khả năng ức chế α -glucosidase với IC_{50} là $5,766 \pm 0,3$ μ g/ml.

Cuối cùng là phân đoạn n-butanol có IC_{50} cao hơn, bằng $8,011 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$. Theo công bố của các tác giả Jung và tập thể, Kumar và tập thể, tác dụng ức chế α -glucosidase của đối tượng cùng loài với với là *Syzygium cumini*: dịch chiết ethanol 70% có IC_{50} là $24,4 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$, dịch chiết acetone có IC_{50} là $19,5 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$, dịch chiết ethylacetate có IC_{50} là $16,6 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ và dịch chiết n-butanol có IC_{50} là $8,3 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$. Chúng tôi nhận thấy rằng hoạt tính ức chế α -glucosidase của các dịch chiết phân đoạn lá với là tương đối tốt.

3.3.2.4. Phân lập, xác định cấu trúc các hợp chất từ cao phân đoạn lá với có hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất

Để làm sáng tỏ nội dung về cấu trúc hóa học của các hợp chất sinh học cũng như góp phần thực tiễn cho đề tài này, chúng tôi bước đầu xác định một số hợp chất trong các phân đoạn thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất, gồm **CHe**, **CEtA**, **CBuOH**. Tiến hành phân lập trên sắc ký cột với chất hấp phụ là silicagel pha thuận và pha đảo với các hệ dung môi thích hợp.

a. β - Sitosterol hay stigmast-5-en-24R-3 β -ol

Đưa lên cột 15 g cao phân đoạn n-hexane. Rửa giải cột bằng hệ dung môi n-hexane : ethylacetate (20:1), thu được khối chất rắn vô định hình, tách lặp lại trên cột silicagel và kết tinh lại trong n-hexane đã thu được những tinh thể hình kim, không màu, có khối lượng 23mg, $R_f=0,5$ (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng là n-hexane : ethylacetate (2:1)), nóng chảy ở $135-136^\circ\text{C}$. Gọi là **H1**.

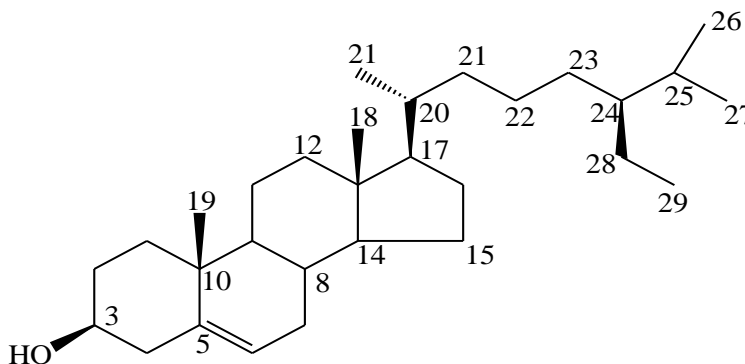
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 0,68 (3H, s, Me-18); 1,01 (3H, s, 19-Me); 2 cụm doublet δ 0,81 và 0,88 ($2 \times 3\text{H}$, d, J 7,7Hz, Me-26 và Me-27); 0,83 (3H, t, 7,32Hz, Me-29); 0,92 (3H, d, J 10 Hz, Me-21); 3,52 (1H, m, H-3 α); 5,35 (1H, d, J 5Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 140,8 (s, C-5); 121,7 (d, C-6); 71,8 (d, C-3); 56,8 (d, C-14); 56,1 (d, C-17); 50,2 (d, C-9); 45,9 (d, C-24); 42,3 (s, C-13); 42,3 (t, C-4); 39,8 (t, C-12); 37,3 (t, C-1); 36,5 (s, C-10); 36,2 (d, C-20); 33,9 (d, C-8); 31,9 (t, C-7); 31,7 (t, C-2); 29,2 (d, C-25); 28,3 (t, C-16); 26,2 (t, C-23); 24,3 (t, C-15); 21,1 (t, C-11); 19,8 (q, C-26); 19,4 (q, C-19); 19,1 (q, C-27); 18,8 (q,

C-21); 11,9 (q, C-29); 11,9 (q, C-18); 23,1 (t, C-28); 42,3 (t, C-4).

Trong các phổ ^1H - và ^{13}C -NMR đã chỉ ra sự có mặt của một nhóm hydroxyl δH tại 3,53ppm (proton của CH liên kết với OH), δC tại 71,82ppm và một nối đôi δH tại 5,35ppm (1H, d, J 5Hz) tín hiệu của proton liên kết với C-6 ở vị trí một nối đôi, δC -5 tại 140,78ppm, s và δC -6 tại 121,72ppm, d), tín hiệu của các proton thuộc 6 nhóm methyl (CH_3) với δH tại 1,02 (3H, s, 19-Me), 0,95 (3H, d, J 10Hz, 21-Me), 0,86 (3H, d, J 7,7Hz, 27-Me), 0,84 (3H, d, J 7,7Hz, 26-Me), 0,82 (3H, t, J 7,32 Hz, 29-Me) 0,69 (3H, s, 18-Me). Phổ ^{13}C -NMR cho biết có tổng số 29 cacbon, trong đó có 3 cacbon bậc 4, 9 nhóm methin (CH), 11 nhóm methylen (CH_2), và 6 nhóm methyl (CH_3). Mặt khác phổ khối EI-MS cho biết $[\text{M}]^+$ 414amu. Về tính chất vật lý điểm nóng chảy của chất này được đem so sánh với mẫu chuẩn và giá trị R_f trên bản mỏng đều thấy phù hợp.

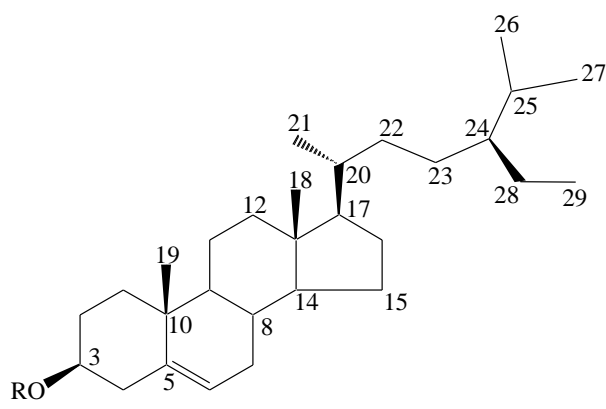
Các dữ liệu về phổ NMR đều phù hợp với β -sitosterol và có công thức trên Hình 3.13.



Hình 3.13. Cấu trúc hợp chất H1 (β -sitosterol)

b. β -sitosterol-glucopyranoside

Tiếp tục rửa giải cột bằng hệ dung môi n-hexane : ethylacetate (20:1), thu được khối chất rắn vô định hình, có khối lượng 21mg, gọi là **H2**. Tiến hành chạy sắc ký bản mỏng với chất chuẩn β -sitosterol-glucopyranoside nhận thấy hai băng chất hoàn toàn trùng nhau cả về vị trí và bắt màu với chất nhuộm. Xác định được chất này chính là β -sitosterol-glucopyranoside có công thức hóa học trên Hình 3.14.



R-glucopyranoside

Hình 3.14. Cấu trúc hợp chất H2 (β -sitosterol-glucopyranoside)

c. 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone

Thay đổi hệ dung môi rửa giải cột theo tỷ lệ n-hexane : ethylacetate (10:1), thu được khối chất rắn vô định hình, tách lặp lại trên cột silicagel và kết tinh lại trong n-hexane đã thu được những tinh thể hình kim, màu vàng, có khối lượng 25mg, $R_f=0,7$ (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng là n-hexane : ethylacetate (2:1)), nóng chảy ở 123-125°C, gọi là **H6**.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 7,99 (1H, d, $J=15,7\text{Hz}$, H-6 α); 7,84 (1H, d, $J=15,7\text{Hz}$, H-6 β); 7,62 (2H, m, H-2,6); 7,40 (2H, m, H-3,5), 7,39 (1H, m, H-4), 3,65 (3H, s, OCH_3 -6'), 2,15 (3H, s, CH_3 -5'), 2,12 (3H, s, CH_3 -3').

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 193,41 (s, C- β'); 162,05 (s, C-2'); 159,33 (s, C-4'); 158,87 (d, C-6'); 142,90 (d, C- β); 135,36 (s, C-1); 130,20 (d, C-4); 128,92 (d, C-3,5); 128,4 (d, C-2,6); 126,73 (d, C- α); 109,4 (s, C-1'), 108,9 (s, C-5'); 106,65 (s, C-3'); 62,33 (OCH_3 -6'); 8,25 (q, CH_3 -5'); 7,57 (q, CH_3 -3').

Phổ FT-IR cho biết có hấp thụ của nhóm OH ở vùng 3508, 3466, hấp thụ tại vùng 2924 và 2697 đặc trưng cho các nhóm CH và CH_2 , hấp thụ ở vùng 1630 đặc trưng cho nhóm carbonyl $\text{C}=\text{O}$, ở vùng 1560, 1439 đặc trưng cho liên kết $\text{C}=\text{C}$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho biết trong phân tử của **H6** có tổng số 18 cacbon. Trong đó có 2 nhóm methyl và một nhóm methoxy (CH_3O) ở các $\delta\text{C}/\text{H}$ 8,25/2,12; 7,57/2,15 và $\delta\text{C}/\text{H}$ 62,33/3,65; 8 cacbon bậc 4 ở các δC 106,65; 108,9; 109,4; 135,36; 159,33; 158,87; 162,05 và 193,41; còn lại 7 cacbon methin (CH) tại các δC 142,29; 130,20; 128,92; 128,92; 128,4; 128,4; 126,7 tương ứng với các

proton methin trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Độ chuyển dịch của các proton thuộc các nhóm methin ở δH lần lượt là 7,84 ; 7,39 ; 7,40 ; 7,62 và 7,99. Ngoài ra trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn xuất hiện tín hiệu của proton thuộc nhóm OH liên kết với cacbon olefin liên kết liên hợp với nhóm carbonyl (CO).



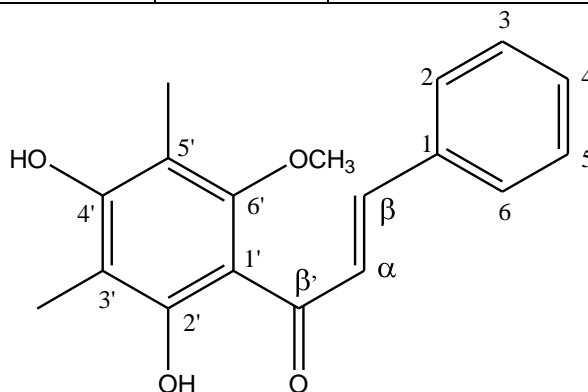
Hình 3.15. Chất H6 tinh sạch (A) và sắc ký đồ bản mỏng chất H6 (B)

Phân tích các số liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cũng như phổ 2 chiều HSQC và HMBC của **H6** thu được, số liệu phổ và các tương tác xa quan sát thấy được trình bày ở bảng 3.7. Việc phân tích các dữ liệu phổ của chất **H6** thu được so sánh với số liệu phổ của 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon của Nguyễn Thị Kim Tuyền và tập thể cho phép khẳng định **H6** là một flavonoid với tên 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon [35]. Số liệu phổ và công thức thể hiện trên Bảng 3.7 và Hình 3.16.

Bảng 3.7. Các số liệu phổ của 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon

C/H	δH (ppm)	δC (ppm)	Tương tác xa H \rightarrow C (HMBC)	C_n
1	-	135,36	-	C
2	7,62 (m)	128,40	C-4, C- β	CH
3	7,40 (m)	128,92	C-1	CH
4	7,39 (m)	130,20	C-2, C-6	CH
5	7,40 (m)	128,92	C-1	CH
6	7,62 (m)	128,40	C- β' , C-4	CH
1'	-	109,4		C
2'	-	162,05		C
3'	-	106,65		C
4'	-	159,33		C
5'	-	108,9		C

C/H	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	Tương tác xa H→C (HMBC)	C _n
6'	-	158,87		C
α	7,99 (1H, d, J=15,7)	126,7	C-1, C- β , C- β'	CH
β	7,84 (1H, d, J=15,7)	142,90	C- α , C- β' , C-1,2,6	CH
β'	-	193,41	-	C
3'-CH ₃	2,12 (3H, s)	8,25	C-2',3',4'	CH ₃
5'-CH ₃	2,15 (3H, s)	7,57	C-4',5',6'	CH ₃
OCH ₃ -6'	3,65 (3H, s)	62,33	C-6'	
2'-OH	13,60	-	C-1', 2', 3'	-



Hình 3.16. Cấu trúc H6 (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'- dimethylchalcon)

d. 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid

Đưa lên cột 15 g cao phân đoạn ethylacetate, rửa giải cột bằng dung môi chloroform thu được hợp chất **C3** có khối lượng 41,9 mg là chất rắn vô định hình, màu trắng, có R_f = 0,76 (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng là n-hexane : ethylacetate (2:1)), điểm nóng chảy 282 -284⁰C.

Cấu trúc hóa học của **C3** được xác định bằng phương pháp quang phổ: IR, MS, 1H-NMR, 13C-NMR, DEPT, HSQC và HMBC.

IR: (ν_{max} cm⁻¹): 3588, 3461, 2937, 1685, 1456.

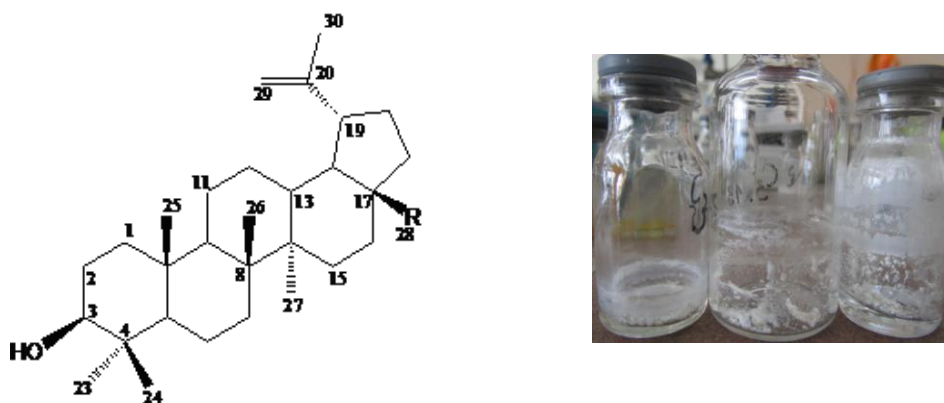
ESI-MS, m/z : 457,36 [M+H]⁺ ứng với công thức phân tử C₃₀H₄₈O₃.

1H-NMR (DMSO): 500MHz, δ (ppm): 4,68 (1H, s, H-29a), 4,55 (1H, s, H-29b), 4,27 (1H, dd, J = 5,0, 3-OH), 2,96 (1H, dd, J = 4,7, 1,5 Hz, H-18), 0,61 (1H, d, J = 9,3 Hz, H-5), 0,64 (3H, s, 24-Me), 0,75 (3H, s, 25-Me), 0,86 (3H, s, 26-Me), 0,86 (3H, s, 23-Me), 0,92(3H, s, 27-Me), 1,63 (3H, s, 30-Me).

¹³C-NMR : thể hiện trên bảng 3.8. Phổ ¹H và ¹³C-NMR của chất **C3** chứng tỏ chúng đều là các triterpenoid. Phổ ¹³C-NMR và DEPT của chất **C3** cho biết có tổng số 30 cacbon, trong đó có 6 nhóm CH₃, 11 nhóm CH₂, 6 nhóm CH, và 6 cacbon bậc 4. Phổ ¹H-NMR cũng chỉ ra sự có mặt của 6 nhóm methyl ở dạng singlet ở vùng trường cao δH 0,64-1,63ppm, một nối đôi ngoại vòng được xác nhận bằng các tín hiệu cộng hưởng proton và cacbon (δH 4,67s, 4,55s và δC 109,62) đặc trưng cho các triterpen khung lupan. Phổ ¹³C-NMR xuất hiện tín hiệu của liên kết đôi (δC 109,62; C-29 và 150,30; C-20), tín hiệu đặc trưng của một nhóm C=O acid (δC 177,22; C-28). Dựa vào kết quả phân tích phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC và HMBC. Kết hợp các số liệu phổ và tài liệu tham khảo cho phép xác định **C3** là 3β-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (bentulinic acid) [108], thể hiện trên Bảng 3.8 và Hình 3.17.

Bảng 3.8. Độ dịch chuyển hóa học ¹³C-NMR của chất C3

Vị trí cacbon	Chất C3	Vị trí cacbon	Chất C3
1	36,02 t	16	31,70 t
2	29,19 t	17	55,41 s
3	76,78 d	18	46,61 d
4	38,49 s	19	48,57 d
5	54,89 d	20	150,30 s
6	17,96 t	21	30,10 t
7	33,92 t	22	38,26 t
8	40,25 s	23	27,14 q
9	49,32 d	24	15,72 q
10	36,72 s	25	15,79 q
11	20,45 t	26	15,93 q
12	25,07 t	27	14,37 q
13	37,59 d	28	177,27 s
14	42,57 s	29	109,62 t
15	29,19 t	30	18,93 q



Hình 3.17. Chất tinh sạch (phải) và xác định cấu trúc C3 (3β-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) (trái)

e. Triterpenoid khung olean (3β-hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid)

Thay đổi hệ dung môi rửa giải cột chloroform : methanol theo tỉ lệ 9:1 thu được khối chất rắn không màu, có khối lượng 27,2mg, $R_f = 0,56$ (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng là n-hexane : ethylacetate (2:1)), nóng chảy ở 262-263°C. Gọi chất này là **LVE2**.

Phổ FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 3428 (OH), 2946, 1738 (C=O), 1693, 1456, 1372, 1246, 1030.

Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5,27 (1H, H-12), 3,22 (1H, dd, J 11,0 và 4,0Hz, H-3), 2,82 (1H, dd, J 8,5 và 4,0Hz, H-18), 1,13 (3H, s, 27-CH₃), 0,98 (3H, s, 25-CH₃), 0,92 (3H, s, 30-CH₃), 0,91 (3H, s, 29-CH₃), 0,90 (3H, s, 23-CH₃), 0,77 (3H, s, 24-CH₃), 0,75 (3H, s, 26-CH₃).

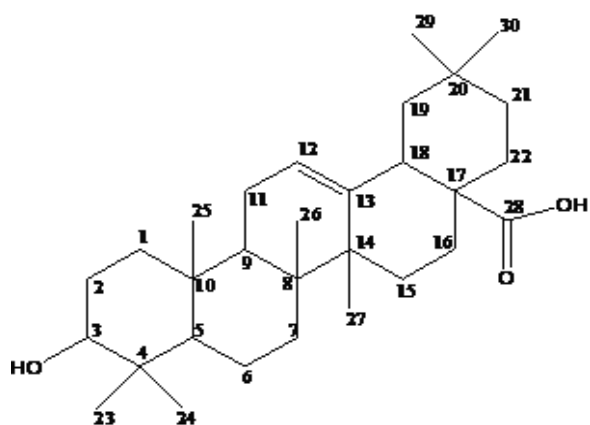
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 183,19 (s, C-28), 143,67 (s, C-13), 122,64 (d, C-12), 79,05 (d, C-3), 55,24 (d, C-5), 47,65 (d, C-9), 46,54 (s, C-17), 45,90 (t, C-19), 41,62 (s, C-14), 41,01 (d, C-18), 39,29 (s, C-8), 38,77 (s, C-4), 38,42 (t, C-1), 37,10 (s, C-10), 33,82 (t, C-21), 33,07 (q, 29-CH₃), 32,64 (t, C-7), 32,45 (t, C-22), 30,68 (s, C-20), 28,11 (q, 23-CH₃), 27,70 (t, C-15), 27,19 (t, C-2), 25,93 (q, 27-CH₃), 23,59 (q, 30-CH₃), 22,79 (t, C-16), 22,94 (t, C-11), 23,03 (t, C-11), 23,41 (q, 30-CH₃), 18,31 (t, C-6), 17,12 (q, 26-CH₃), 15,55 (q, 24-CH₃), 15,33 (q, 25-CH₃).

Trong các phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT đã cho biết trong phân tử của chất LVE2 có 30 nguyên tử cacbon. Trong đó có 07 nhóm methyl (CH_3), 10 nhóm methylen (CH_2), 5 nhóm methin (CH) và 8 nguyên tử cacbon bậc 4 đặc biệt có 1 cacbon đặc trưng cho $\text{C}=\text{O}$ của carboxylic acid. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ quan sát thấy đặc trưng của nhóm $\text{C}=\text{O}$ ở δC 183,19ppm. Các dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho phép xác định công thức phân tử chất này là $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Đây là một triterpen có 5 vòng cùng với một liên kết đôi, một acid.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ ở vùng trường thấp có tín hiệu cộng hưởng của proton olefinic (δH 5,27ppm, H-12) với cacbon tương ứng δC 122,64ppm. Ngoài ra độ dịch chuyển δH 3,22 (1H, dd, J 11,0 và 4,0Hz, H-3) của proton thuộc nhóm hydroxymethin là H-3 β với cacbon tương ứng δC 79,05ppm. Tín hiệu doublet ở δH 2,82 (1H, dd, J 8,5 và 4,0Hz, H-18) là của một proton methin H-18 với cacbon tương ứng δC 41,01 ppm. Các tín hiệu của 7 nhóm methyl đều xuất hiện dưới dạng singlet trong vùng 1,13 (3H, s, 27- CH_3), 0,98 (3H, s, 25- CH_3), 0,92 (3H, s, 30- CH_3), 0,91 (3H, s, 29- CH_3), 0,90 (3H, s, 23- CH_3), 0,77 (3H, s, 24- CH_3), 0,75 (3H, s, 26- CH_3).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ quan sát thấy tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi ở δC 122,64ppm và 143,61ppm ứng với C-12 và C-13. Tất cả các dữ liệu phổ trên đã cho phép khẳng định LVE2 là một triterpen kiểu khung olean.

Phân tích các dữ kiện phổ HSQC và phổ HMBC cho thấy tín hiệu δC 180,20ppm của gốc carboxylic acid có tương tác với δH -18 2,80ppm và H-16, H-22. Kết hợp so sánh các dữ liệu phổ thu được với tài liệu phổ của oleanolic acid đã cho thấy độ dịch chuyển hoá học hoàn toàn phù hợp [67, 72]. Điều này cho phép khẳng định cấu trúc của chất LVE2 là oleanolic acid với tên gọi 3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid. Hình 3.18 là sắc ký đồ bản mỏng và cấu trúc của LVE2, Bảng 3.9 là số liệu phổ cacbon của LVE2.



Hình 3.18. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc hóa học của LVE2 (3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid) (trái)

Số liệu phổ cacbon của LVE2 được thể hiện trên bảng 3.9

Bảng 3.9. Số liệu phổ cacbon của LVE2 (3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid) và phổ của oleanolic acid.

Vị trí	δ_C ppm			
	LVE2(CDCl ₃)		oleanolic acid (CDCl ₃)	
1	38,42	t	38,5	t
2	27,19	t	27,4	t
3	79,05	d	78,7	d
4	38,77	s	38,7	s
5	55,24	d	55,2	d
6	18,31	t	18,3	t
7	32,64	t	32,6	t
8	39,29	s	39,3	s
9	47,65	d	47,6	d
10	37,10	s	37,0	s
11	22,94	t	23,1	t
12	122,64	d	122,1	d
13	143,61	s	143,8	s
14	41,62	s	41,8	s
15	27,70	t	27,7	t
16	22,79	t	23,4	t
17	46,54	s	46,6	s
18	41,01	d	41,1	d
19	45,90	t	45,8	t
20	30,68	s	30,6	s

Vị trí	δ_c ppm			
	LVE2(CDCl ₃)		oleanolic acid (CDCl ₃)	
21	33,82	t	33,80	t
22	32,45	t	32,3	t
23	28,11	q	28,1	q
24	15,55	q	15,6	q
25	15,33	q	15,3	q
26	17,12	q	16,8	q
27	25,94	q	26,0	q
28	183,19	s	181,0	s
29	33,07	q	33,1	q
30	23,41	q	23,6	q

f. 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid

Thay đổi hệ dung môi rửa giải cột bằng hệ chloroform : methanol theo tỷ lệ 80:20 thu được khối chất rắn vô định hình. Khối chất rắn này lại tinh chế trên cột silicagel cỡ hạt 0,040 – 0,063mm, hệ dung môi rửa giải chloroform – methanol tỷ lệ 85:15 thu được hỗn hợp hai chất. Thực hiện lại trên cột hệ dung môi rửa giải chloroform : methanol theo tỷ lệ 9:1 thu được chất rắn vô định hình **LVE4** có khối lượng 98,8mg, Rf = 0,75 (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng là chloroform : methanol (5:1)), nóng chảy ở 295-296⁰C.

Phổ FT-IR ν_{max} (cm-1): 3450, 2936, 1690, 1457, 1385, 1050.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-MeOD), δ (ppm): 5,24 (1H, s, H-12), 3,72 (1H, dt, J 10,0, 4,0Hz, H-2), 3,53 (1H, d, J 11,07Hz, H-23b), 3,35 (1H, d, J 9,61Hz, H-3), 3,31 (1H, d, J 9,98Hz, H-23a), 2,19 (1H, d, J 11,0Hz, H-18), 1,09 (3H, s, CH₃-27), 1,02 (3H, s, CH₃-26), 0,95 (3H, s, CH₃-29), 0,85 (3H, d, J 6,0Hz, CH₃-30), 0,81 (3H, s, CH₃-25), 0,78 (3H, s, CH₃-24).

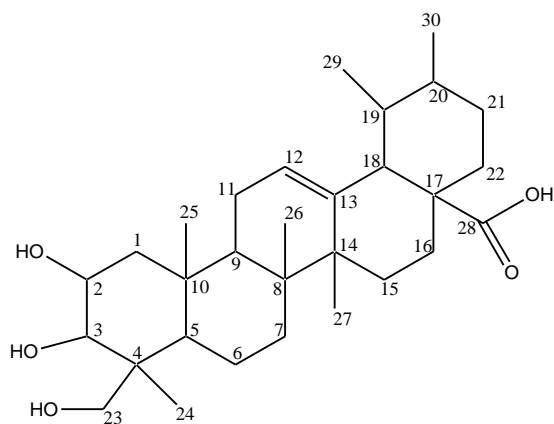
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃-MeOD), δ (ppm): 180,56 (s, C-28), 138,23 (s, C-13), 125,06 (d, C-12), 78,80 (d, C-3), 68,21 (d, C-2), 68,06 (t, C-23), 52,61 (d, C-18), 47,62 (s, C-17), 48,28 (d, C-5), 47,25 (d, C-9), 45,98 (t, C-1), 42,39 (s, C-4), 41,97 (s, C-14), 39,21 (s, C-8), 38,90 (d, C-19), 38,72 (d, C-20), 37,77 (s, C-10), 36,63 (t, C-22), 32,33 (t, C-7), 30,47 (t, C-21), 27,78 (t, C-15), 23,98 (t, C-16),

23,13 (t, C-11), 23,30 (q, 27-CH₃), 20,91 (q, 30-CH₃), 17,98 (t, C-6), 16,90 (q, 26-CH₃), 16,76 (q, 25-CH₃), 16,71 (q, 29-CH₃), 12,65 (q, 24-CH₃).

Phổ FT-IR cho biết có hấp thụ của nhóm OH ở vùng 3450cm⁻¹, nhóm CH ở vùng 2936cm⁻¹, ngoài ra trong phổ còn quan sát thấy hấp thụ của nhóm C=O trong vùng 1690cm⁻¹ và liên kết đôi (C=C) ở vùng 1457cm⁻¹.

Phổ ¹H-NMR cho biết có 6 tín hiệu của nhóm CH₃ ở độ dịch chuyển 1,09 (3H, s, CH₃-27), 1,02 (3H, s, CH₃-26), 0,95 (3H, s, CH₃-29), 0,85 (3H, d, J 6,0Hz, CH₃-30), 0,81 (3H, s, CH₃-25), 0,78 (3H, s, CH₃-24). 2 tín hiệu của nhóm CH ở δH 3,72 (1H, dt, J 10,0, 4,0Hz, H-2) và δH 3,35 (1H, d, J 9.61Hz, H-3), đặc trưng của proton H-18 là 2,19 (1H, d, J 11,0Hz, H-18) gắn với C-18 ở 52,61ppm, và ở δH 5,27ppm là tín hiệu của nhóm CH với cacbon tương ứng là 125,06ppm.

Phổ ¹³C-NMR và DEPT cho biết trong phân tử có 30 nguyên tử cacbon, những số liệu này đã cho phép khẳng định chất **LVE4** là một triterpenoid. Trong đó có 6 nhóm CH₃, 9 nhóm CH₂, 8 nhóm CH, và 7 cacbon bậc 4 trong đó 1 cacbon đặc trưng cho C=O của acid. Trên phổ ¹³C-NMR quan sát thấy đặc trưng của nhóm C=O ở δC 181,56ppm, 2 tín hiệu của CH-OH ở δC-3 78,80ppm với proton tương ứng δH 3,35ppm và δC-2 68,21ppm với proton tương ứng δH 3,72ppm. Ngoài ra còn tín hiệu của nhóm CH₂-OH ở δC-2368,06ppm tương tác với các proton H-23a và H-23b là 3,31ppm và 3,53ppm. Các số liệu về phổ của **LVE4** cho thấy hoàn toàn phù hợp với phổ của asiatic acid hay 2α,3β,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid [29].



Hình 3.19. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc hóa học của **LVE4** (2α,3β,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid) (trái)

g. Hợp chất C7 là một flavonoid (quercetin)

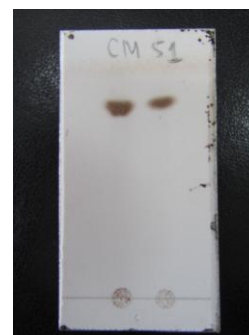
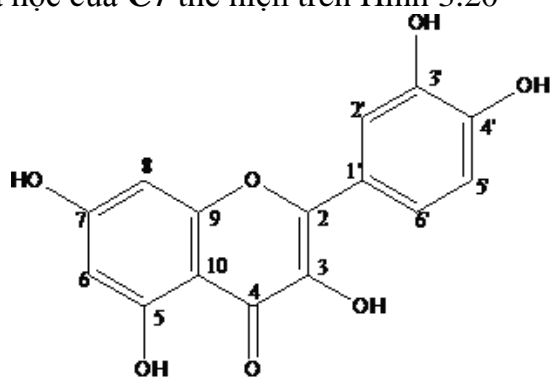
Đưa lên cột 15 g cao phân đoạn n-butanol, rửa giải bằng hệ dung môi chloroform : methanol tỷ lệ 95:5, thu được chất kết tinh hình kim màu vàng rom có khối lượng 15mg, gọi là C7.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 12,48 (1H, s, 5-OH), 10,79 (1H, s, 7-OH), 7,67 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$, H-2'), 7,54 (1H, dd, $J=2,0$ và $8,5\text{Hz}$, H-6'), 6,87 (1H, d, $J=8,5\text{Hz}$, H-5'), 6,40 (1H, d, $J=1,5\text{Hz}$, H-8), 6,18 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 175,82 (s, C-4), 163,86 (s, C-7), 160,70 (s, C-5), 156,11 (s, C-9), 147,68 (s, C-4''), 146,78 (s, C-2), 145,04 (s, C-3'), 135,71 (s, C-3), 121,93 (s, C-1'), 119,95 (d, C-6'), 115,58 (d, C-5'), 115,03 (d, C-2') 102,99 (s, C-10), 98,16 (d, C-6), 93,33 (d, C-8).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho biết các tín hiệu đặc trưng cho proton thơm ở độ dịch chuyển nằm trong vùng 7,67 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$, H-2'), 7,54 (1H, dd, $J=2,0$ và $8,5\text{Hz}$, H-6'), 6,87 (1H, d, $J=8,5\text{Hz}$, H-5'), 6,40 (1H, d, $J=1,5\text{Hz}$, H-8), 6,18 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$, H-6). Ngoài ra là tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxyl ở trong vùng 12,48 (1H, s, 5-OH), 10,79 (1H, s, 7-OH), 9,59 (1H, s), 9,36 và 9,30.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho biết có tổng số 15 cacbon, trong đó có đặc trưng của nhóm C=O nằm trong độ dịch chuyển 175,82ppm, ngoài ra là tín hiệu của cacbon liên hợp ở trong vùng 115-160ppm. Tất cả những số liệu nêu trên cho thấy hợp chất C7 là một flavonoid khi so sánh các dữ kiện phổ với các tài liệu thu được đã cho phép kết luận đây là hợp chất quercetin với công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, cấu trúc hóa học của C7 thể hiện trên Hình 3.20



Hình 3.20. Sắc ký đồ bản mỏng (phải) và cấu trúc hóa học của quercetin (trái)

3.3.2.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất đã phân lập từ lá vối

Chúng tôi đã tinh sạch và xác định được cấu trúc hóa học của 7 hợp chất có trong các phân đoạn n-hexane, ethylacetate và n-butanol lá vối. Bảng 3.10 là thành phần phần trăm các hợp chất trong từng cao chiết phân đoạn lá vối.

Bảng 3.10. Phần trăm khối lượng của các chất tinh sạch từ lá vối

Phân đoạn	Tên chất	Khối lượng (mg)	% so với cao phân đoạn
CHe	<i>H1</i> : β - Sitosterol	23	0,15
	<i>H2</i> : β -sitosterol-glucopyranoside	21	0,14
	<i>H6</i> : 2',4'-dihydroxy- 6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon	25	0,17
CEtA	<i>C3</i> : 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid	41,9	0,28
	<i>LVE2</i> : 3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid	27,7	0,185
	<i>LVE4</i> : 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid	98,8	0,66
CBuOH	<i>C7</i> - quercetin	15	0,1

Trong số 7 hoạt chất phân lập được 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid chiếm tỷ lệ lớn nhất trong cao phân đoạn (0,66%), tiếp theo là 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (0,28%) và 3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid (0,185%). Các hợp chất còn lại chiếm tỷ lệ trong cao phân đoạn gần như tương đương nhau.

Hai chất β -Sitosterol và β -sitosterol-glucopyranoside là hai chất rất phổ biến trong thực vật. Việc phân lập ra hợp chất **H6** không phải là hoàn toàn mới [120]. Đã có một số nghiên cứu về chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon, nổi bật là nghiên cứu mới nhất trong năm 2011 của tác giả Huang và tập thể đã khẳng định tác dụng ảnh hưởng ngược của hợp chất chalcone này lên khả năng kháng nhiều loại thuốc trong việc chống lại dòng tế bào ung thư biểu mô gan ở người [69]. Ngoài ra hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon chiết xuất từ *Prosothamnus polydenius* có khả năng chống lại kí sinh trùng [103]. Các hợp chất chalcone khác chiết xuất từ lá vối được xác định có khả năng chống oxi hóa và chống ung thư rất tốt [87].

Hợp chất 3β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (**C3**) hay còn gọi là bentunilic acid qua tham khảo đã được chứng minh là có tác dụng kháng khuẩn, chống sốt rét, ngừa khối u, chống ung thư và kháng HIV. Bentunilic acid có thể được phân lập từ dịch chiết methanol của *Quisqualis fructus*, từ dịch chiết dichloromethane-methanol của cành cây *Coussarea paniculata*, từ hỗn hợp dịch chiết dichloromethane-methanol (tỷ lệ 1:1 về thể tích) của cây họ đậu *Caesalpinia paraguariensis*, từ dịch chiết methanol lá cây *Vitex negundo*, từ dịch chiết ethanol của rễ cây *Anemone raddeana*, từ lá và thân của *Doliocarpus schottianus*, từ dịch chiết ethanol của *Tovomita krukovii*, quả *Chaenomeles lagenaria*, từ dịch chiết methanol, n-hexane và ethylacetate của rễ cây *Berlinia grandiflora*, từ dịch chiết methanol của phần trên mặt đất cây râu mèo của Việt Nam *Orthosiphon stamineus*, từ lá của *Eucalyptus camaldulensis*, từ lá của cây *Syzygium claviflorum* [121].

Đối với hợp chất 3β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid (**LVE2**) đã được khẳng định về khả năng kháng HIV, kháng khuẩn, chống nhiễm khuẩn, chống lại bệnh Antileishmanial là bệnh nhiệt đới do protozoa ký sinh thuộc chi *Leishmania*. Nhóm hợp chất oleanoic acid đã được phân lập từ một số thực vật như lá của *Rosa woodsii*, lá và thân cây *Prosopis glandulosa*, toàn bộ thân cây *Phordendron juniperinum*, từ lá của *Syzygium claviflorum*, toàn bộ thân của *Hyptis capitata*, từ phần trên mặt đất của *Ternstroemia gymnanthera*...

Với $2\alpha,3\beta,23$ -trihydroxy-urs-12en-28-oic acid (**LVE4**), nhóm hoạt chất asiatic acid được nghiên cứu về khả năng làm lành mau chóng vết thương đồng thời để lại sẹo rất bé, hoạt tính gây độc trên nguyên bào sợi hay cảm ứng apoptosis (chết theo chương trình) đối với các tế bào ung thư thuộc các giai đoạn khác nhau. Asiatic acid thu được từ dịch chiết của cây *Centella asiatica* thường thấy ở Châu Á từ Trung Quốc đến Madagasca, ngoài ra asiatic acid còn được phân lập từ một số loài thuộc chi *Syzygium* là *S. claviflorum* và *S. resinosum*...

Quercetin (**C7**) có khả năng chống oxi hóa rất mạnh, ức chế oxi hóa LDLc, ức chế con đường chuyển hóa nitric acid, chống viêm, chống ung thư, chống histamin. Quercetin đã được phân lập từ lá chè xanh *Camellia sinensis*, táo, hành

đặc biệt là hành đỏ, nho đỏ, cà chua hay từ dịch chiết methanol của cây *Ginkgo biloba*, và từ dịch chiết ethanol của *Eunymus alatus* (Thunb.) Sieb...

Về đối tượng với *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr.&Perry, các nhà khoa học Trung Quốc đã xác định được trong lá và nụ hoa với có tinh dầu, các thành phần flavonoid của với, tách được 9 hợp chất từ nụ với [119]. Tác giả Hoàng Văn Lựu đã xác định được các thành phần trong nụ với : β -myrcen, (Z)- β -ocimen, (E)- β -ocimen, β -caryophyllen, α -pinen và (E)-nerolidol, 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethyl chalcone; 5,7-dihydroxy-6,8 dimethyl flavanon; 7-dihydroxy-5-methoxy-6,8-dimethyl flavanon, oleanoic acid. Nguyễn Thị Kim Tuyền và tập thể đã xác định được 3 hợp chất 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethyl chalcone, oleanolic acid, maslinic acid từ nụ với [35]. Các hợp chất chalcone từ với có khả năng chống oxi hóa và chống ung thư. Gần đây nhất năm 2010, nhóm tác giả Min B.S. đã xác định thành phần các flavonoid từ nụ với Việt Nam bao gồm: 5,7,8,4'-tetrahydroxy-3',5'-dimethoxyflavone-3-O- β -D-galactopyranoside, gossypetin-8-3'-dimethylether-3-O- β -D-galactoside, myricetin-3'-methylether-3-O- β -D-galactopyranoside, myricetin-3'-methylether, quercetin, kaempferol và tamarixetin. Trước đó nhóm nghiên cứu đã phân lập được các chất sau : 3'-formyl-4,4',6'-trihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone; 3'-formyl-4,6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone 4'-O- β -D-glucopyranoside; (2S)- 8-formyl-6-methylaringenin và (2S)-8-formyl-6-methyl-naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside từ phân đoạn ethylacetate.

Như vậy khi nghiên cứu thành phần hóa học trên cây với, nếu như các công bố khác tập trung vào nụ với thì đề tài luận án đã phân lập và tinh sạch được 7 hợp chất trong lá với, các hợp chất này tuy không phải là mới nhưng nghiên cứu hoàn toàn có ý nghĩa khoa học. Trong đó có hai hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong với là bentunilic acid (C3) và asiatic acid (LVE4).

3.3.3. Cao chiết phân đoạn lá chè đắng

Đối với chè đắng, theo tên gọi của Trung Quốc là *Kudincha*, trên thế giới đã nghiên cứu về hoạt tính sinh học chủ yếu là chống oxi hóa, khả năng giảm mỡ máu

cũng như về thành phần hóa học, hiện những tham khảo về khả năng chống ĐTĐ của lá chè đắng trên thế giới là không nhiều [98]. Do đó mẫu lá chè đắng được chọn để xác định phân đoạn cao chiết có hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất, tinh sạch được hoạt chất chính trong phân đoạn đó và tìm hiểu cơ chế tác dụng của chúng.

3.3.3.1. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn lá chè đắng

Sau khi tách chiết bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần, chúng tôi thu được các phân đoạn tương ứng. Cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm chúng tôi thu được cao chiết phân đoạn có khối lượng trình bày trên Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Phần trăm tách chiết cao phân đoạn lá chè đắng

	Bột khô	CNN	CHe	CEtA	CBuOH	CNC
Khối lượng (g)	3000	780	95	167	188	305
Phần trăm tách chiết (%)	---	---	12,1	21,4	24	39,1

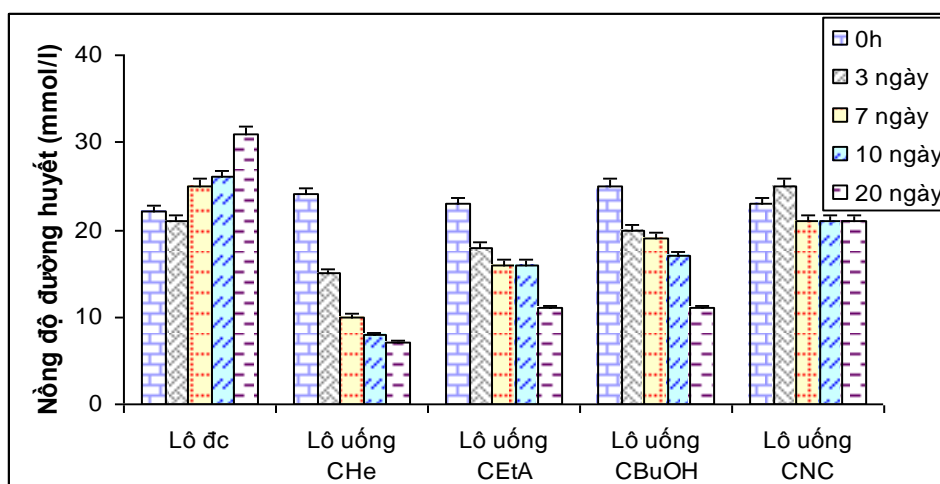
CHe lá chè đắng chiếm tỷ lệ thấp nhất (12,1%), tiếp đến là **CEtA** (21,4%) và **CBuOH** (24%). Cuối cùng là **CNC** chiếm tỷ lệ cao nhất (39,1%). Tiếp theo chúng tôi sử dụng một phần cao phân đoạn để cho chuột ĐTĐ type 2 uống, phần còn lại chúng tôi đem đi phân lập bằng sắc ký cột để xác định thành phần hóa học.

Kết quả nồng độ đường huyết chuột ĐTĐ type 2 sau khi cho uống cao chiết phân đoạn lá chè đắng thể hiện trên Bảng 3.12 và Hình 3.21.

Bảng 3.12. Nồng độ đường huyết chuột ĐTĐ type 2 sau khi uống cao chiết phân đoạn lá chè đắng

Stt	Lô chuột	Nồng độ đường huyết của chuột Xtb±SD (mmol/l)				
		0 giờ	3 ngày	7 ngày	10 ngày	20 ngày
1	Lô đ/c	22,2±3,7	20,7±3,5	24,6±2,4	25,5± 1,4	30,6 ±2,1
2	CHe	23,7±1,1	14,7±1,5*	10,5±1,9**	8,3±2,5***	7,2±1,4***
3	CEtA	22,6±3,3	18,1±1,7*	16,3±2,6**	16,1±1,5**	10,7±1,9**
4	CBuOH	25,3±1,6	19,6±1,3*	18,5±1,8*	16,6±1,3**	11,2±1,1**
5	CNC	23,4±2,6	24,9±2,2*	21,2±1,5*	21,5±1,9*	20,6±2,6*

(Xtb là giá trị trung bình của 10 chuột, SD: độ lệch chuẩn, * p>0,05, ** p<0,05, *** p<0,01, p so với lô đối chứng ở cùng thời điểm)



Hình 3.21. Nồng độ đường huyết chuột cho uống cao chiết phân đoạn lá chè đắng

Tương tự mẫu lá vôi, các cao chiết phân đoạn lá chè đắng thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tại thời điểm 7 ngày ($p < 0,05$), sau đó càng rõ hơn tại thời điểm 10 ngày và 20 ngày ($p < 0,01$). Chuột được cho uống **CHE** có đường huyết giảm từ $23,7 \pm 1,1 \text{ mmol/l}$ về $7,2 \pm 1,4 \text{ mmol/l}$. Trong khi các phân đoạn khác cũng thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tuy nhiên chưa thật sự tốt. Riêng **CNC** không có tác dụng hạ đường huyết. Chúng tôi dự đoán **CHE** có ảnh hưởng tới hoạt tính hạ đường huyết của cao chiết nước tổng số. So với công bố của tác giả Phùng Thanh Hương khi nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các phân đoạn cao chiết lá bằng lắng nước trên chuột nhất gây tăng đường huyết bởi tiêm STZ liều 150 mg/kg , thấy rằng tại thời điểm ngày thứ 10, phân đoạn n-hexane và phân đoạn nước có tác dụng hạ đường huyết khá tốt (đường huyết hạ về $7,56 \pm 0,76 \text{ mmol/l}$ và $6,19 \pm 0,31 \text{ mmol/l}$). Thấy rằng phân đoạn **CHE** của lá chè đắng thể hiện hoạt tính hạ đường huyết tương đối tốt. Từ kết quả này chúng tôi chọn phân đoạn **CHE** lá chè đắng để nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như nghiên cứu cơ chế tác dụng của cao chiết và các chất tinh sạch về hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase.

3.3.3.2. Thành phần hóa học của phân đoạn n-hexane lá chè đắng

Rửa giải cột chạy phân đoạn n-hexane lá chè đắng bằng hệ dung môi n-hexane : ethylacetate theo tỉ lệ 95:5 thu được khối chất rắn vô định hình. Khối chất này được kết tinh lại trên cột silicagel cỡ hạt $0,040 - 0,063 \text{ mm}$, hệ dung môi rửa giải cột n-hexane : ethylacetate theo tỉ lệ 19:1, kết tinh lại trong methanol thu được chất

vô định hình kim có khối lượng 19,3mg, $R_f = 0,8$ (hệ dung môi chạy sắc ký bản mỏng chloroform : methanol (9:1)), nhiệt độ nóng chảy 222- 223⁰C.

Phổ FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3542, 2933, 1703, 1644, 1451.

ESI-MS (m/z): 470.8 [M]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃-MeOD), δ (ppm): 4,68 (1H, s, H-29a), 4,56 (1H, s, H-29b), 3,66 (3H, s, OCH₃), 3,34 (1H, d, J 1, 2Hz, 3-OH), 3,05 (1H, dt, J 4Hz ν_{μ} 12Hz, H-19), (1H, dt, J 4Hz ν_{μ} 12Hz, H-19), 1,67 (3H, s, H-30), 1,38 (3H, s, H-23), 1,03 (3H, s, H-26), 0,93 (3H, s, H-27), 0,79 (3H, s, H-28), 0,67 (3H, s, H-25).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃-MeOD), δ (ppm) : 178,43 (s, C-24), 150,83 (s, C-20), 109,37 (t, C-29), 78,25 (d, C-3), 56,45 (d, C-9), 51,10 (s, OCH₃), 49,85 (d, C-5), 49,01 (d, C-4), 48,20 (d, C-18), 47,93 (d, C-19), 42,98 (s, C-17), 40,58 (s, C-8), 39,96 (t, C-22), 39,35 (t, C-16), 38,07 (d, C-13), 37,35 (s, C-10), 35,51 (t, C-7), 34,22 (t, C-1), 29,81 (t, C-21), 28,27 (t, C-15), 27,39 (t, C-2), 25,15 (t, C-12), 23,49 (q, 23-Me), 21,30 (t, C-11), 20,06 (t, C-6), 19,28 (q, 30-Me), 18,02 (q, 28-Me), 15,81 (q, 26-Me), 14,42 (27-Me), 13,68 (25-Me).

Phổ FI- IR cho biết có hấp thụ của nhóm OH ở vùng 3542cm⁻¹, nhóm CH ở 2933cm⁻¹, hấp thụ ở vùng 1703cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C=O, ở vùng 1685 và 1456cm⁻¹ đặc trưng cho liên kết C=C.

Trong các phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR kết hợp với phổ DEPT đã cho biết trong phân tử của chất **H4** có 31 nguyên tử cacbon trong đó có 7 nhóm methyl, 11 nhóm methylen, 6 nhóm methin và 7 nguyên tử cacbon bậc 4.

Phổ khối lượng ESI-MS cho [M+H]⁺ 470amu. Các dữ liệu phổ ¹³C-NMR với ESI-MS cho phép xác định công thức phân tử chất này là C₃₁H₅₀O₃. Đây là một triterpen có 5 vòng cùng với một liên kết đôi và một nhóm hydroxyl trong phân tử.

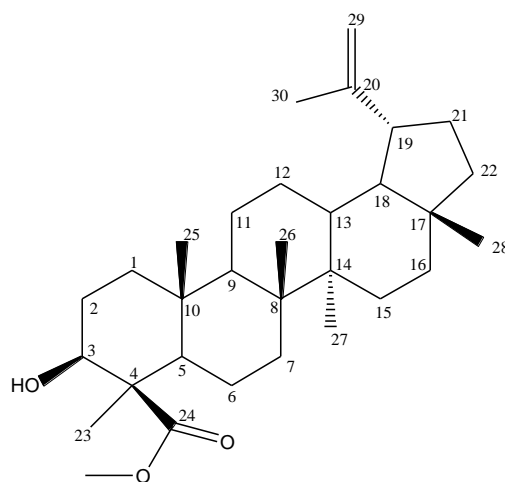
Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR ở vùng trường thấp có tín hiệu cộng hưởng của hai proton olephinic (δ_H 4,68ppm và 4,56ppm, H-29a và H-29b) với cacbon tương ứng δ_C 109,37ppm. Khi phân tích phổ HSQC là phổ tương tác trực tiếp giữa cacbon và hydro cho biết 2 proton này thuộc nhóm methylen olephin, đây là tương tác rất đặc

trung của các triterpen thuộc kiểu khung lupan. Ngoài ra ở vùng trường cao còn có tín hiệu ở δ_H 3,05 (1H, dt, J 4Hz và 12Hz, H-19) là của một proton thuộc nhóm hydroxymethin là H-3 β với cacbon tương ứng là δ_C 78,25ppm. Tín hiệu doublet triplet ở δ_H 2,37 (1H, dd, J 4,7Hz và 1,5Hz, H-19) là của một proton methin H-19 với cacbon tương ứng δ_C 47,93ppm. Các tín hiệu của 6 nhóm methyl đều xuất hiện dưới dạng singlet trong vùng (δ_H 0,67 – 1,67ppm). Trên phổ 1H -NMR cho thấy có tín hiệu của proton ở dạng singlet đặc trưng cho nhóm OCH_3 ở δ_H 3,66 (3H, s) với cacbon tương ứng δ_C 51,10ppm.

Trên phổ ^{13}C -NMR quan sát thấy tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi ở δ_C 109,70ppm và 150,44ppm ứng với C-29 và C-20. Đặc biệt trên phổ ^{13}C -NMR còn quan sát thấy tín hiệu đặc trưng cho nhóm C=O acid ở độ dịch chuyển δ_C 178,43ppm.

Kết hợp các dữ liệu phổ với tài liệu đã cho phép khẳng định cấu trúc của chất **H4** hoàn toàn phù hợp với cấu trúc hóa học của chất 24-methyl(3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid)ester [108].

Cấu trúc hóa học của **H4** được trình bày trên Hình 3.22, số liệu phổ cacbon và phổ proton được trình bày trên Bảng 3.13.



Hình 3.22. Cấu trúc phân tử của H4

(24 methyl (3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid) ester)

Dưới đây là bảng phân tích số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của **H4**

Bảng 3.13. Các số liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của H4

Vị trí	H4		
	δ_C ppm (CDCl ₃)		δ_H ppm (J Hz)
1	34,22	t	
2	27,39	t	
3	78,25	d	(1H, dt, J 4Hz và 12Hz, H-19)
4	49,01	s	
5	56,45	d	
6	20,06	t	
7	35,51	t	
8	40,58	s	
9	49,85	d	
10	37,35	s	
11	21,30	t	
12	25,15	t	
13	38,07	d	
14	42,81	s	
15	28,27	t	
16	39,35	t	
17	42,98	s	
18	48,20	d	
19	47,93	d	2,37(1H, dt, J 4Hz và 12Hz, H-19)
20	150,83	s	
21	29,81	t	
22	39,96	t	
23	23,49	q	1,38(3H, s)
24	178,43	s	
25	13,68	q	0,67 (3H, s)
26	15,81	q	1,03 (3H, s)
27	14,42	q	0,93 (3H, s)
28	18,02	q	0,79 (3H, s)
29	109,3	t	4,69 (1H, s, H-29a),
30	19,28	q	1,67 (3H, s)
OCH ₃	51,10	q	3,66 (3H, s)

Đối tượng lá chè đắng được các nhà khoa học nghiên cứu khá kỹ về thành phần hóa học, xác định sự có mặt của các triterpenoid saponin, kudinchagenin I. [94, 117, 126]. Theo các công bố trước đã xác định được các thành phần hóa học sau

trong lá chè đắng : triterpen saponin : kudinoside A-P, latifolioside A, C, G, H, ilekudinoside A-V, Ilexoside XLVIII, cynarasaponin; terpenoid: α - β -và γ -kudinlacton, ilekudinol A, B, C, kudinolic acid; kudinchagenin; beta-sitosterol; hợp chất phenolic, ursolic acid; flavonoid: quercetin, kaempferol, nicotiflorin quercetin, isopercitrin; flavonoid glycosid; tinh dầu [92, 93]. Tuy nhiên với 01 hợp chất duy nhất phân lập được cũng là một đóng góp mới về thành phần hóa học của lá chè đắng.

3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Chúng tôi đã thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các chất tinh sạch nhằm xác định cơ chế hạ đường huyết của chúng. Với 8 chất tinh sạch đã xác định được 05 chất thể hiện hoạt tính, kết quả được trình bày theo thứ tự hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase giảm dần (IC_{50} tăng dần). Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của Acarbose được xác định với IC_{50} là 0,12 mg/ml. Bảng 3.14 là kết quả chi tiết về hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các chất tinh sạch.

Bảng 3.14. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của 5 chất tinh sạch từ lá vối, lá chè đắng

Stt	Tên chất	CTPT	IC_{50} (μ g/ml)	IC_{50} (mol/l)
1	24-methyl(3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid)ester (H4)	$C_{31}H_{50}O_3$	$3,4 \pm 0,7$	71×10^{-8}
2	3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid (C3)	$C_{30}H_{44}O_3$	$3,6 \pm 0,5$	$79,3 \times 10^{-8}$
3	2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (H6)	$C_{18}H_{18}O_3$	$4,3 \pm 0,2$	153×10^{-7}
4	2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid (LVE4)	$C_{30}H_{48}O_5$	$5,7 \pm 0,5$	117×10^{-7}
5	3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid (LVE2)	$C_{30}H_{48}O_3$	$6,1 \pm 0,3$	133×10^{-7}

Đây là một điểm mới mà đề tài luận án chúng tôi đã thực hiện được khi nghiên cứu về cơ chế hạ đường huyết trên hai đối tượng lá vối và lá chè đắng. So với các giá trị IC_{50} của các hợp chất trong bảng tổng hợp 1.4, cũng như IC_{50} của Acarbose, chúng tôi nhận thấy IC_{50} của các chất tinh sạch này là tương đối thấp,

điều này khẳng định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các chất tinh sạch là khá mạnh [71]. Theo nhóm tác giả Trần Tuyết Mai đã nhận thấy khả năng ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết nước mẫu nụ với *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry, nghiên cứu khả năng ức chế maltase và sucrase tách chiết từ ruột chuột cống *invitro* xác định được giá trị IC_{50} tương ứng là 0,70 and 0,47 mg/ml [80]. Hiện chưa có công bố nào trên thế giới về khả năng ức chế enzym α -glucosidase của các hoạt chất chiết xuất từ lá vối. Hình 3.23 là hình ảnh thử khả năng ức chế enzym α -glucosidase.



Hình 3.23. Khả năng ức chế enzym α -glucosidase của một số hoạt chất

Chú thích : ống nghiệm màu đỏ đối chứng (+); ống nghiệm màu hồng nhạt: mẫu (+)

Có thể khẳng định khả năng hạ đường huyết của các cao chiết phân đoạn nói riêng và cao tổng nước nói chung được quyết định bởi các thành phần hóa học này. Theo tham khảo, các chất tinh sạch có một số hoạt tính khác như chống khối u, kháng khuẩn, chống oxi hóa. Với hai chất bentulinic acid và oleanolic acid đã được khẳng định có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase khá tốt [48]. Tuy các chất tinh sạch này không phải là lần đầu tiên được phân lập tuy nhiên với công bố về hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của 04 chất tinh sạch được từ lá vối là tính mới của luận án.

Kết quả ức chế enzym α -glucosidase của chất 24-methyl (3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid) ester tách chiết từ **Chè** lá chè đắng là công bố đầu tiên trong những nghiên cứu trên thế giới về lá chè đắng. Nếu so sánh với 04 hợp chất phân lập từ lá vối thì hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của 24-methyl (3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid) ester từ lá chè đắng mạnh nhất. Hoạt tính ức chế enzym

α -glucosidase của **CHe** lá chè đắng: ức chế 55% hoạt tính của α -glucosidase tại nồng độ $7,84 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$. Đây cũng là kết quả nghiên cứu đầu tiên về khả năng ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết phân đoạn lá chè đắng.

3.4. NGHIÊN CỨU BẢO CHẾ VÀ TÁC DỤNG CỦA CHẾ PHẨM THIVODA

Các phương pháp chữa trị hiện thời với bệnh nhân đái tháo đường là tập trung vào kiểm soát và làm giảm đường huyết về mức bình thường. Các cơ chế được sử dụng cho cả chữa trị Tây y và truyền thống nhằm làm giảm đường huyết là : (1) Kích thích tế bào β của đảo tụy tiết ra insulin; (2) Ức chế các hormon làm tăng đường huyết; (3) Làm tăng số lượng, ái lực hay độ nhạy với insulin của các thụ thể của insulin; (4) Làm giảm sự giải phóng glycogen; (5) Tăng cường sự tiêu thụ glucose trong các mô và cơ quan; (6) Loại bỏ các gốc tự do, chống lại sự peroxy hóa các lipid và sửa chữa rối loạn trao đổi lipid và protein; (7) Nâng cao sự vi tuần hoàn trong cơ thể [71]. Các thuốc được sử dụng trong lâm sàng để chữa trị đái tháo đường có thể chia thành: insulin, chất kích thích bài tiết insulin, các yếu tố làm tăng độ nhạy cảm với insulin, các yếu tố tăng trưởng giống insulin, các chất ức chế aldose reductase, các chất ức chế α -glucosidase và các chất ức chế sự glycosyl hóa protein, hầu hết trong số chúng là thuốc hóa học hay sinh hóa [54].

Từ những kết quả nghiên cứu thu được chúng tôi đã tiến hành chọn lọc các thực vật, chiết xuất, bào chế và nghiên cứu chế phẩm được đặt tên là **Thivoda**. Chúng tôi đã không thu được một lượng lớn lá tầm gửi trên cây mít và vỏ thân ôi nên hai mẫu này không được dùng làm thành phần của chế phẩm.

3.4.1. Chọn lọc chế phẩm nguồn gốc từ thực vật có khả năng hạ đường huyết

Khi tổ hợp các thực vật để tạo thành các chế phẩm sinh học, mỗi chế phẩm cho khuyết một thành phần, nhận thấy chế phẩm khuyết mẫu củ chuối hột không làm ảnh hưởng đến hoạt tính hạ đường huyết trên chuột, ngược lại chế phẩm khuyết mẫu lá vối thì hoạt tính hạ đường huyết giảm hẳn. Từ đó khẳng định vai trò quan trọng của lá vối, mẫu củ chuối hột được loại ra khỏi chế phẩm. Cuối cùng, chúng tôi đã chọn ra 4 loài thực vật làm thành phần chế phẩm **Thivoda**, bao gồm:

- Chó đẻ răng cưa–*Phyllanthus urinaria* L. thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae)

- Chè đắng–*Ilex kaushue* S.Y.Hu thuộc họ Trâm Bùi (Aquifoliaceae)
- Vối–*Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr.& Perry thuộc họ Sim (Myrtaceae)
- Dây thìa canh–*Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult thuộc họ Thiên lý (Asclepiadaceae)

Các mẫu thực vật nghiên cứu được định tên khoa học bởi PGS.TS Vũ Xuân Phương và ThS.Nguyễn Thế Cường (Phòng thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật). Hình 3.24 là các thực vật làm thành phần của chế phẩm Thivoda.



Trái : Chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria* L.

Phải : Dây thìa canh *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult



Nụ và lá vối *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr.& Perry

Chè đắng *Ilex kaushue* S.Y.Hu



Hình 3.24. Các đối tượng thực vật là thành phần của chế phẩm Thivoda

3.4.1.1. Định tính thành phần hóa học có trong 5 mẫu thực vật

Chúng tôi đã tiến hành các phản ứng định tính nhằm phát hiện sự có mặt của 6 nhóm hợp chất rất phổ biến trong thực vật sau: saponin, flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, glycoside. Kết quả định tính thành phần hóa học được trình bày trên Bảng 3.15.

Bảng 3.15. Kết quả định tính thành phần hóa học

Stt	Nhóm chất	Phản ứng thử-thuốc thử	Kết quả				
			Lá với	Nụ với	Chó đẻ răng cưa	Chè đắng	Dây thìa canh
1	Saponin	Phản ứng tạo bọt với NaOH	-	+	+	+	-
		Phản ứng tạo bọt với HCl	+	-	+	+	++
		Phản ứng màu	-	-	xanh lá cây	xanh lá cây	xanh lá cây
2	Flavonoid	Phản ứng Shinoda	++	++	+	+	+
		Phản ứng với NaOH		--	++	-	+
		Phản ứng với H ₂ SO ₄	-	+	-	++	-
3	Alkaloid	Phản ứng Vans-Mayer	-	++	-	-	++
		Phản ứng Dragendorff	-	++	+	+	++
4	Tanin	Phản ứng với Vanillin	-	++	+	+++	++
		Phản ứng với FeCl ₃	-	-	++	-	-
5	Steroid	Phản ứng Lieberman-	+	+	+	+	+
6	Glycoside	Phản ứng Keller-Killan	+	+	+	+	+

Qua kết quả định tính chúng tôi nhận thấy rằng với 5 mẫu thực vật được sử dụng làm nguyên liệu bào chế chế phẩm **Thivoda** đều có phản ứng định tính dương tính với một số chất thử, do đó có thể khẳng định hoạt chất sinh học có trong các

mẫu thực vật này hết sức phong phú, chứa một số thành phần trong số nhóm hợp chất: alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid, glycoside.

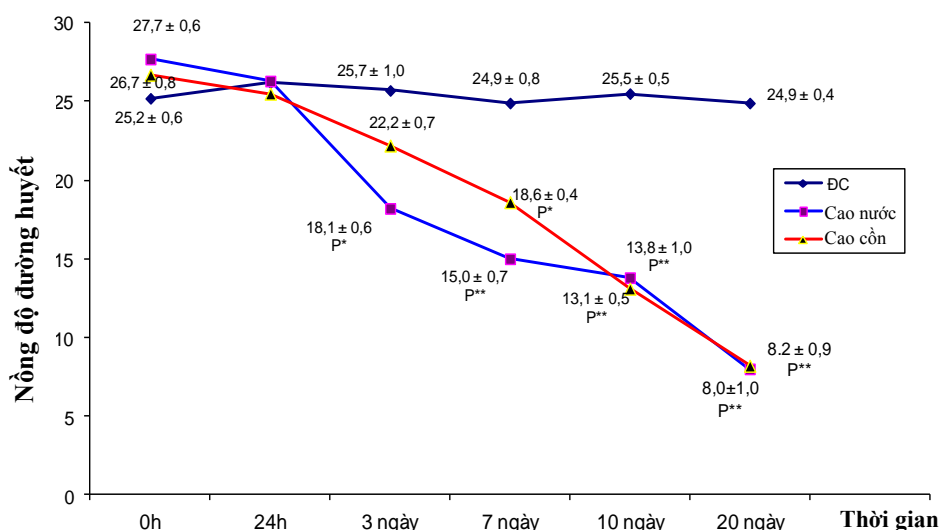
3.4.1.2. Tác dụng hạ đường huyết của cao tổng nước và cao tổng cồn

Tiến hành chiết bằng nước và cồn, trộn 5 loại cao nước thành phần với tỷ lệ 1:1:1:1:1 về khối lượng, thu cao nước, trộn 5 loại cao cồn thành phần thu cao cồn. Tỷ lệ 1:1:1:1:1 là tỷ lệ phối trộn các thành phần chế phẩm đơn giản nhất mà chúng tôi tham khảo được từ một số thực phẩm chức năng và theo tư vấn của một số nhà khoa học chuyên ngành dược học. Nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của cao nước và cao cồn trên chuột nhắt ĐTĐ type 2. Cao cồn và cao nước được sấy khô, nghiền thành bột mịn, hòa với nước cất, cho chuột uống vào mỗi buổi sáng với liều 500mg/kg.

Chúng tôi phân ra 3 lô chuột thí nghiệm. Mỗi lô 10 con chuột ĐTĐ type 2. Cho uống liên tục trong vòng 20 ngày các mẫu như sau:

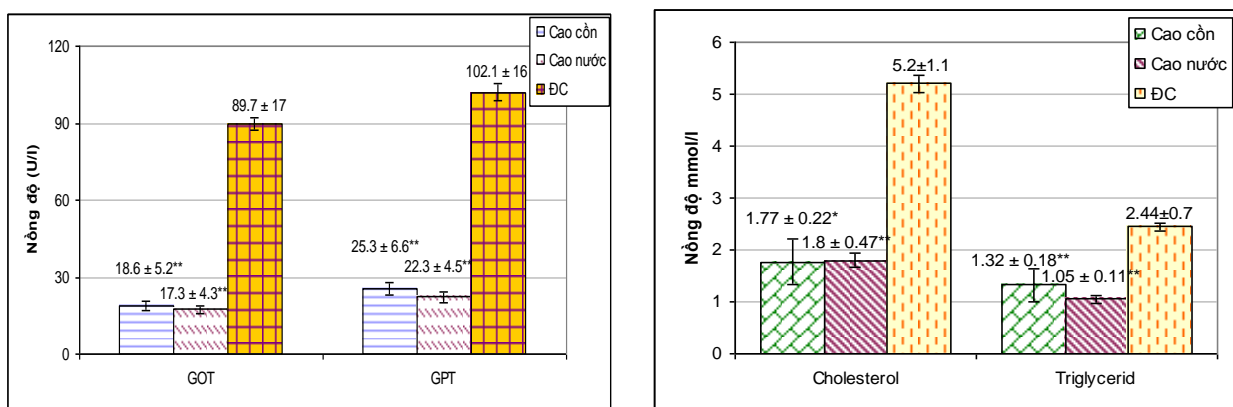
- Lô 1: Uống cao tổng cồn liều 500mg/kg thể trọng chuột
- Lô 2: Uống cao tổng nước liều 500mg/kg thể trọng chuột
- Lô 3: Uống dung dịch nước muối sinh lý 0,9%

Đường huyết được kiểm tra vào các thời điểm 0 giờ, 24 giờ, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 20 ngày. Kết quả được trình bày trên Hình 3.25.



Hình 3.25. Nghiên cứu khả năng điều hòa đường huyết của cao tổng số
($p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,001$, p so với nhóm đối chứng)

Cao nước và còn đều thể hiện hoạt tính điều hòa đường huyết, cụ thể giảm tương đương nhau, đường huyết về mức khá ổn định, so với nhóm đối chứng chuột ĐTD type 2 không được điều trị, đường huyết đã giảm được hơn 68% ($p < 0,001$). Để nghiên cứu về tác dụng phục hồi các tổn thương trên gan và điều hòa tình trạng rối loạn lipid máu, sau khi điều trị chuột trong 20 ngày, tiến hành lấy máu xét nghiệm một số chỉ số hóa sinh: GOT, GPT, cholesterol, triglyceride. Kết quả được trình bày trên Hình 3.26.



Hình 3.26. Chỉ số men gan (trái) và các chỉ số mỡ máu (phải)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (p so với nhóm đối chứng)

Với lô chuột ĐTD type 2 chỉ được uống nước muối sinh lý các chỉ số GOT và GPT tăng cao do gan của chúng bị tổn thương mạnh. Khi gan bị tổn thương thì các enzym GOT và GPT sẽ được tiết nhiều vào máu, làm tăng sự chuyển hóa tạo các keto acid gây độc cho cơ thể. Ở lô chuột ĐTD type 2 được điều trị bằng cao nước và cao còn chỉ số GOT và GPT giảm hơn so với lô đối chứng và sự khác nhau này hoàn toàn có ý nghĩa thống kê.

So sánh hai chỉ số mỡ máu là cholesterol và triglyceride, đối với lô chuột đối chứng chỉ uống nước muối sinh lý, nhận thấy nồng độ cholesterol và triglyceride ở mức cao hơn so với lô chuột được điều trị bằng cao tổng còn và cao tổng nước nóng. Ở lô chuột được uống cao tổng nước có các nồng độ cholesterol và triglycerid thấp nhất. Khi so sánh sự khác nồng độ cholesterol và triglycerid của chuột uống cao nước và cao còn so với lô đối chứng có ý nghĩa thống kê do $p < 0,001$. Chúng tôi đã quyết định dùng nước để chiết xuất các mẫu thực vật trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2. Bào chế và nghiên cứu chế phẩm Thivoda có tác dụng điều hòa đường huyết trên chuột nhắt đái tháo đường type 2

3.4.2.1. Bào chế chế phẩm Thivoda

Chế phẩm **Thivoda** được bào chế thủ công với thành phần trình bày trên Bảng 3.16. Do điều kiện về thời gian, chúng tôi đã đưa ra tỷ lệ phối trộn các cao thành phần là 1:1:1:1:1 theo khối lượng cao thô của từng mẫu, đây có thể chưa phải là tỷ lệ tối ưu cho chế phẩm **Thivoda**. Tuy nhiên với các cao chiết thực vật thành phần có hoạt tính hạ đường huyết *in vivo* và *in vitro*, chế phẩm **Thivoda** sẽ được xác định lại về tác dụng hạ đường huyết. Nếu có điều kiện chúng tôi sẽ nghiên cứu các tỷ lệ phối trộn khác để thu được chế phẩm Thivoda có tác dụng tốt nhất.

Bảng 3.16. Thành phần chế phẩm Thivoda

Mẫu \ Khối lượng	Mẫu khô (kg)	Cao thô (kg)	Thành phần cốm (kg)	Thành phần viên nang (mg)
Nụ vối	4,3	1,0	0,55	70
Lá vối	6,0	1,0	0,57	70
Chó đẻ răng cưa	5,3	1,0	0,48	70
Dây thìa canh	3,5	1,0	0,51	70
Chè đắng	4,8	1,0	0,55	70
Tá dược	-----	-----	1	150
Tổng số	23,9	5,0	3,5	500

Lượng cốm thành phẩm được đóng nang, nang được sử dụng là nang số 0 được sản xuất tại công ty SUHEUNG CAPSULE, viên nang chế phẩm có khối lượng khoảng 500mg, tổng số lượng viên nang chế phẩm **Thivoda** thu được là 7000 viên. Tiêu chuẩn chất lượng chung của viên nang chế phẩm:

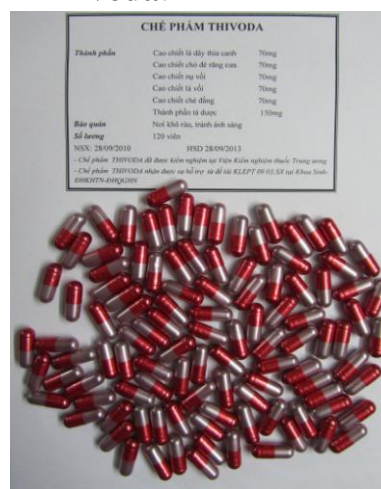
+ Hình thức: cốm phải khô đồng đều về kích thước hạt, không có hiện tượng hút ẩm, bị mềm và biến màu. Nang số 0, vỏ gồm 2 nửa hình trụ kín lồng khít vào nhau. Bên trong có chứa chế phẩm.

+ Kích thước hạt: Toàn bộ cốm phải qua rây số 2000. Tỷ lệ nát vụn qua rây số 250 không vượt quá 8% khối lượng toàn phần.

+ Độ ẩm: xác định nước trong cốm theo phương pháp cân xác định độ ẩm, các thuốc cốm không chứa quá 5% nước.

- + Tính hòa tan và phân tán: thêm 20 phần nước nóng vào 1 phần thuốc cốm, khuấy trong 5 phút, loại thuốc cốm tan phải hoàn toàn tan hết, không có tạp chất lạ.
- + Độ đồng đều về khối lượng: khối lượng trung bình thuốc trong nang $\pm 10\%$.
- + Bảo quản: thuốc cốm phải được chiếu tia tử ngoại trong vòng 8 giờ, viên nang được bảo quản trong các túi polyetylen kín, đóng với số lượng 60 viên nang/túi, có nhãn đúng qui định. Để nơi khô mát.

Hình 3.27 là một số hình ảnh về chế phẩm **Thivoda**:

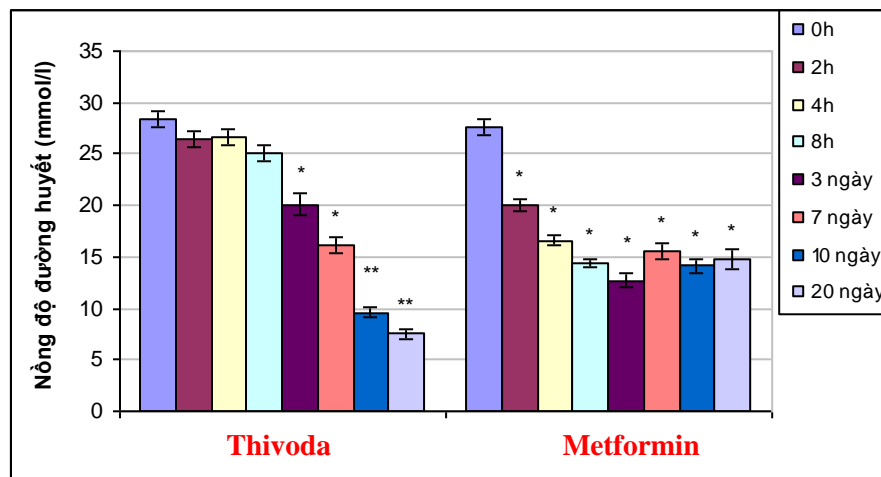


Hình 3.27. Dụng cụ đóng viên nang (trái), chế phẩm Thivoda (phải)

3.4.2.2. Nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhắt ĐTĐ type 2

Trong quá trình bào chế chế phẩm chúng tôi đã sử dụng các thao tác đều liên quan đến xử lý nhiệt. Do đó xác định khả năng hạ đường huyết của chế phẩm **Thivoda** trên chuột, chúng tôi bố trí thí nghiệm cho chuột nhắt ĐTĐ type 2 uống chế phẩm **Thivoda** với liều 500mg/kg/ngày và so sánh với chuột ĐTĐ type 2 điều trị bằng Metformin liều 500mg/kg/ngày.

Kết quả thể hiện trên Hình 3.28. Tại thời điểm 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ và sau 3 ngày, đường huyết của chuột cho uống chế phẩm Thivoda vẫn ở mức tương đối cao. Tuy nhiên sau khi điều trị đến ngày thứ 7 trở về sau đường huyết của chuột giảm dần ($16,2 \pm 1,8$ tương đương mức giảm 43%), đến ngày thứ 20 thì đường huyết của chuột đã trở về mức bình thường và ổn định ($7,5 \pm 1,4$ mmol/l tương đương mức giảm 71% và có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$).



Hình 3.28. Khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda và Metformin

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, p so với thời điểm 0 giờ cùng nhóm)

Nhận thấy thuốc Metformin có tác dụng hạ đường huyết nhanh chóng trong vòng 2 giờ và 4 giờ từ thời điểm bắt đầu sử dụng thuốc (giảm từ $27,6 \pm 2,1$ xuống còn $20,1 \pm 1,4$ và $16,6 \pm 2,5$ mmol/l) tuy nhiên khi sử dụng thuốc trong một thời gian dài thì đường huyết của chuột không những không giảm mà còn có dấu hiệu tăng trở lại chứng tỏ Metformin chỉ có tác dụng hạ đường huyết tức thời và không bền vững (trở về mức đường huyết giống tại thời điểm 8 giờ là khoảng 15mmol/l), cũng do Metformin được khuyến cáo nên sử dụng kèm với các thuốc hạ đường huyết khác hoặc kết hợp với Insulin.

Ngoài ra chúng tôi đã cho các con chuột nhất bình thường uống chế phẩm Thivoda liều 500mg/kg/ngày, thấy có sự thay đổi đường huyết rất ít, sự khác nhau do ngẫu nhiên và không có ý nghĩa thống kê. Như vậy khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhất ĐTĐ type 2 là ổn định và có tác dụng kéo dài, không gây hạ đường huyết xuống thấp và đột ngột. Với cơ chế tác dụng tương tự Acarbose bản chất là các chất ức chế enzym α -glucosidase nên không gây tụt đường huyết ở đối tượng động vật bình thường. Chế phẩm Thivoda có tác dụng hạ đường huyết khá ổn định là do tác dụng hiệp lực của các thành phần thực vật.

3.4.2.3. Cơ chế hạ đường huyết

Một trong những liệu pháp điều trị cho bệnh nhân ĐTĐ type 2 là làm chậm lại quá trình hấp thu glucose dựa vào cơ chế ức chế enzym, như là enzym α -

glucosidase trong các cơ quan tiêu hóa. Các chất ức chế là các saccharide đóng vai trò ức chế cạnh tranh với enzym α -glucosidase có trong ruột non, Arcabose là một loại thuốc có cơ chế tác dụng như vậy. Acarbose liên kết ái lực với các enzym theo trình tự glycoamylase > sucrase > maltase > dextranase và không có ái lực với enzym β -glucosidase như lactase [74, 116].

Kết quả ức chế enzym α -glucosidase của chế phẩm **Thivoda**: ức chế 60,6 % hoạt tính α -glucosidase tại nồng độ $6,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ (tương đương theo tính toán IC_{50} là $5,51 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$). IC_{50} của Thivoda gần như tương đương với IC_{50} của các phân đoạn lá vối và lá chè đắng, do đó chế phẩm Thivoda đã thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase. Hoàn toàn khẳng định được rằng hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase là do tác dụng của các thành phần lá vối, lá chè đắng và nụ vối, đặc biệt là thành phần các flavonoid được nghiên cứu về khả năng ức chế α -glucosidase và α -amylase [114, 126]. Có thể chế phẩm Thivoda còn có tác dụng theo một số cơ chế khác nữa, tuy nhiên trong giới hạn nghiên cứu luận án hiện chưa làm sáng tỏ được.

Chúng tôi rất chú ý đến thành phần dây thìa canh và chó đẻ răng cưa, theo tham khảo của một số tác giả trên thế giới đã khẳng định *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult có khả năng tiêu hủy đường glucose hay khả năng hồi phục, tái tạo tế bào β tuyến tụy, với thành phần hoạt chất quan trọng là gymnemic acid, thuộc nhóm saponin triterpenoid có hoạt tính hạ đường huyết, chống viêm, kháng ngọt [78, 105]. Vai trò của gymnemic acid trong điều hòa cân bằng glucose nội môi dường như có liên quan đến sự hấp thu glucose trong ruột giảm và sự tái sinh của việc tiết insulin trong tuyến tụy. Sự kích thích tiết insulin bởi các tế bào beta của tuyến tụy được nhận thấy là có liên quan đến sự tăng tính thấm của màng tế bào với insulin hơn là tác động trực tiếp lên các cơ chế tiết của tế bào [89, 90]. Nhóm nghiên cứu của Sugihara đã tìm hiểu khả năng chống tăng đường huyết của dịch chiết saponin thô và 5 triterpene glycoside bao gồm gymnemic acid I-IV và gymnemasaponin V từ dịch chiết methanol của lá *Gymnema sylvestre* R. BR. trên chuột gây tăng đường huyết bởi STZ. Kết quả là dịch chiết thô saponin với liều 60mg/kg đã làm giảm đường huyết sau 2-4 giờ. Riêng gymnemic acid IV với liều

3,4-13,4mg/kg đã làm giảm đường huyết từ 13,5 đến 60,0% sau 6 giờ, tuy nhiên lại không làm giảm đường huyết của chuột bình thường. Gymnemic acid IV với liều 13,4 mg/kg làm tăng nồng độ của insulin huyết tương ở chuột ĐTĐ bởi STZ, không ức chế hoạt tính của α -glycosidase tách chiết từ ruột non của chuột nhất bình thường. Việc tách chiết, thu gymnemic acid *in vitro* từ việc nhân giống bằng mô sẹo ngày càng được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm và được trồng khá dễ dàng với những kỹ thuật đơn giản [91].

Tại Việt Nam, nhóm tác giả Trần Văn Ôn đã nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết của dây thìa canh *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult Việt Nam trên đối tượng chuột nhất trắng bình thường và chuột nhất tăng đường huyết khi tiêm STZ liều 150 mg/kg. Mẫu nghiên cứu là *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult được thu hái tại miền Bắc Việt Nam. Dịch chiết dây thìa canh có tác dụng hạ đường huyết trên cả chuột bình thường (37,58%) và trên chuột tăng đường huyết bởi STZ (27,81%). Tác dụng cao nhất là ở 2 giờ và duy trì đến 4 giờ. Liều dùng thích hợp lá dây thìa canh là 10g lá khô/kg thể trọng [25]. Với mẫu *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br.ex Schult nhóm nghiên cứu chúng tôi thu hái tại vùng đất cát ven biển Quảng Trị dưới sự hướng dẫn thực địa của TS.Trần Thế Bách và ThS. Nguyễn Thế Cường (Viện Sinh thái và Tài nguyên thực vật).

Đối với cây chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria*, chứa nhiều hợp chất thuộc các nhóm hóa học: flavonoid như astragalin, kaempferol, quercetin, isoquercetin, rutin; triterpen như stigmatsterol, stigmatsterol-3-O- β -glucosid, β -sitosterol, glucosid, lup-20(29)-en-3 β -ol; tanin như ellagic acid, 3,3',4-triglyceride-O-methyl ellagic acid, galic acid; phenol như methyl brevifolin carboxylat; acid hữu cơ như succinic acid, ferulic acid; các loại lignan như phyllanthin, hypophyllanthin, phyllanthusin F, phyllanthusin G và các thành phần khác như n-octadecan, methyl dehydrochebulat, ... Gần đây, Lee S.S đã nghiên cứu thành phần hóa học của chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria* của Đài Loan và phân lập được 4 lignan mới có tên là 5-demethoxyniranthin, urinatetralin, dextrobursehernin, urinaligran, cùng với 9 lignan đã biết. Zhang L.Z và nhóm nghiên cứu đã phân lập được một hợp chất mới là ellagi-tannin [51, 124].

Các thí nghiệm về cây chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria* L. với kháng nguyên HbsAg và với tổn thương gan do carbontetraclorit gây nên đã chứng minh đối tượng thực vật này có khả năng chống virus viêm gan [125]. Cây chó đẻ răng cưa có tác dụng kháng khuẩn với tụ cầu vàng, trực khuẩn mủ xanh, trực khuẩn coli, *Shigella dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.shigae*, *Moraxella*, và kháng nấm với *Aspergillus fumigatus*. *Phyllanthus urinaria* L. còn có tác dụng bảo vệ tế bào gan rất tốt.

Ở Việt Nam có rất ít công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và dược lý học của các loài cây thuộc chi *Phyllanthus* [33]. Nhóm tác giả Trần Đình Thắng và tập thể đã phân lập và xác định được cấu trúc của hai hợp chất phenolic từ cây chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria* L. ở Việt Nam là: methyl brevipholin carboxylat và 4'-methoxyscutellarein trong đó hợp chất 4'-methoxyscutellarein lần đầu tiên tìm thấy tại cây này [31]. Trong khi đó với hai loài khác thuộc chi *Phyllanthus* là *Phyllanthus niruri* L. và *Phyllanthus amarus* tại Việt Nam đã được nghiên cứu khá đầy đủ về thành phần hóa học cũng như khả năng hạ đường huyết trên chuột nhắt trắng thực nghiệm [11, 12]. Trên thế giới nhóm nghiên cứu của Ali H. đã xác định được khả năng ức chế α -amylase của các thành phần chiết xuất từ *Phyllanthus amarus* [42].

Với khả năng hạ đường huyết của *Phyllanthus urinaria* L. trong đề tài này, có thể khẳng định đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam xác định được tác dụng hạ đường huyết của đối tượng thực vật này. Khi bổ sung làm thành phần của chế phẩm Thivoda, chúng tôi mong muốn chế phẩm ngoài tác dụng hạ đường huyết còn có một số tác dụng khác nữa như kháng khuẩn hay phục hồi tổn thương gan.

3.4.2.4. Nghiên cứu độc tính cấp của chế phẩm Thivoda

Nghiên cứu độc tính cấp nhằm ban đầu xác định độ an toàn của chế phẩm. Khi sử dụng chế phẩm ngắn hạn cũng rất cần phát hiện độc tính có thể xảy ra, hoặc sau khi dùng thuốc kéo dài. Thông thường càng sử dụng thuốc kéo dài trên người càng phải thử nghiệm kéo dài trên súc vật [7, 34]. Đối với chế phẩm **Thivoda**, chúng tôi đã tiến hành xác định độc tính cấp toàn thân trên chuột nhắt trắng thực nghiệm. Sau khi cho chuột uống chế phẩm Thivoda với liều lượng tăng dần, theo dõi hoạt động của chuột thấy rằng:

+ Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột: Sau khi uống mẫu thử ở các mức liều 1, 2, 3 không thấy có biểu hiện khác thường. Chuột ở mức liều 4 sau khi uống mẫu thử khoảng 2 giờ thấy chuột có biểu hiện giảm hoạt động nhẹ. Ở mức liều 5 có 1 chuột chết sau khi uống mẫu thử 2 giờ, số chuột còn lại trong nhóm giảm hoạt động đáng kể.

+ Sau 24 giờ không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc, chuột ăn uống và hoạt động bình thường trở lại trừ ở mức liều 5 có thêm 2 chuột bị chết.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc: Chuột ở các mức liều 1, 2, 3 không nhận thấy có dấu hiệu ngộ độc. Chuột ở mức liều 4 có biểu hiện triệu chứng nhẹ và hồi phục nhanh. Ở mức liều 5, khoảng 2 giờ sau khi uống mẫu thử lần 3 có 1 chuột chết, chuột có biểu hiện giảm hoạt động, nằm mê. Trong 24 giờ theo dõi có thêm 2 chuột chết. Sau 24 giờ không nhận thấy còn biểu hiện ngộ độc, chuột ăn uống và hoạt động bình thường trở lại. Số chuột thí nghiệm được theo dõi theo bảng 3.17.

Bảng 3.17. Bảng theo dõi chuột thí nghiệm LD₅₀

Nhóm chuột	Liều dùng (g/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột chết (con)	Tỷ lệ chuột chết (%)
1	16,7 g/kg	10	0	0
2	25,0 g/kg	10	0	0
3	33,3 g/kg	10	0	0
4	41,7 g/kg	10	0	0
5	50,0 g/kg	10	3	30

Với nghiên cứu độc tính cấp đã không xác định được LD₅₀ do ở mức liều tối đa có thể cho chuột uống chỉ có 30% chuột chết. Đã xác định được mức liều dưới liều chết (LD₀) là 41,7 g mẫu thử/kg chuột (tương đương 87 viên nang/kg chuột).

Ngoài ra chế phẩm Thivoda được xác định về chỉ tiêu giới hạn các vi sinh vật đạt yêu cầu qui định của Dược điển Việt Nam IV.

Với kết quả thu được chúng tôi nhận thấy chế phẩm Thivoda có nguồn gốc từ những thực vật rất quen thuộc, một số loài cây cỏ được nhân dân sử dụng để uống hàng ngày, do đó khả năng chế phẩm gây độc là rất ít. Chúng tôi rất hy vọng trong tương lai sẽ tiếp tục nghiên cứu để ứng dụng chế phẩm Thivoda dùng trong việc hỗ trợ điều trị bệnh nhân ĐTĐ type 2.

KẾT LUẬN

1. Xác định 8/24 mẫu thực vật được điều tra có tác dụng hạ đường huyết trên chuột nhắt ĐTĐ type 2 gồm lá vối, nụ vối, dây thìa canh, chó đẻ răng cưa, chè đắng, vỏ thân ổi, lá tầm gửi trên cây mít, củ chuối hột. Trong đó các mẫu lá vối, thân và lá chó đẻ răng cưa, vỏ thân ổi, lá tầm gửi trên cây mít, củ chuối hột là phát hiện đầu tiên ở Việt Nam về hoạt tính hạ đường huyết.

2. Đối với mẫu lá vối:

- Đã xác định được 03 cao chiết phân đoạn có khả năng hạ đường huyết tốt nhất trên chuột ĐTĐ type 2 là: **CHe, CEtA, CBUOH**.

- Đã phân lập và xác định được 07 chất trong lá vối là β -sitosterol (**H1**); β -sitosterol glucopyranoside (**H2**); 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcon (**H6**); 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid(**C3**); 3 β -hydroxy-olean-12(13)-en-28-oic acid) (**LVE2**) ; 2 α ,3 β ,23-trihydroxy-urs-12en-28-oic acid (**LVE4**); quercetin (**C7**). Trong đó hai hợp chất **C3** và **LVE4** tuy không phải là chất mới nhưng lần đầu tiên được phân lập và tinh sạch từ vối.

- Công bố đầu tiên về hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao phân đoạn lá vối và của các chất tinh sạch. IC₅₀ của các phân đoạn **CHe, CEtA, CBUOH** lần lượt là: 5,037 \pm 0,6; 5,766 \pm 0,3; 8,011 \pm 0,7 μ g/ml; IC₅₀ các hoạt chất **H6, C3, LVE2, LVE4** tương ứng là 4,3 \pm 0,2; 3,6 \pm 0,5; 6,1 \pm 0,3; 5,7 \pm 0,5 μ g/ml.

3. Đối với mẫu lá chè đắng:

CHe lá chè đắng có tác dụng hạ đường huyết trên chuột ĐTĐ type 2 và ức chế 55% hoạt tính của α -glucosidase tại nồng độ 7,84 μ g/ml. Hợp chất **H4** phân lập từ **CHe** được xác định là 24-methyl (3 α -hydroxy-lup-20(29)-en-24-oic acid) ester gây ức chế 59,5% hoạt tính của enzyme α -glucosidase tại nồng độ 4 μ g/ml.

4. Cao nước lá vối và lá chè đắng ngoài tác dụng hạ đường huyết còn có tác dụng phục hồi gan chuột ĐTĐ type 2 bị tổn thương.

5. Chế phẩm Thivoda có tác dụng hạ đường huyết:

- Thành phần chế phẩm Thivoda gồm: lá vối, nụ vối, lá dây thìa canh, thân và lá chó đẻ răng cưa và lá chè đắng.

- Chế phẩm Thivoda có khả năng hạ đường huyết trên chuột ĐTĐ type 2 một cách ổn định, tại ngày thứ 20 về mức 7,5 \pm 1,4 mmol/l tương đương mức giảm 71% (p<0,001).

- Chế phẩm Thivoda không gây hạ đường huyết ở chuột nhắt bình thường.
- Chế phẩm có hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase với IC_{50} là $5,51 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$.
- Không xác định được độc tính cấp của chế phẩm Thivoda, chỉ tiêu giới hạn vi sinh vật đạt yêu cầu qui định của Dược điển Việt Nam.

ĐỀ NGHỊ

Qua những kết quả nghiên cứu thu được chúng tôi thấy rằng nguồn tài nguyên thực vật của Việt Nam rất quý giá và tiềm năng. Chế phẩm Thivoda có nguồn gốc từ những thực vật quen thuộc, giống với các thảo dược dùng trong Đông y, do đó khả năng chế phẩm gây độc là rất ít. Luận án hy vọng sẽ góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng. Để đạt được mục tiêu đó chúng tôi xin đưa ra ba đề nghị sau:

- Nghiên cứu một số cơ chế tác dụng gây hạ đường huyết khác ngoài khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của chế phẩm Thivoda và của các hoạt chất phân lập được.
- Xác định được các tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm Thivoda như chỉ tiêu cảm quan, lý hóa, vi sinh vật, hàm lượng kim loại nặng, hàm lượng các chất độc hại không mong muốn, độc tính bán trường diễn, từ đó đề xuất thăm dò lâm sàng trên người qua các giai đoạn.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Chính, Đặng Thanh Thủy, **Hà Thị Bích Ngọc**, Nguyễn Văn Mùi (2010), “Điều tra và nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của quả nhàu, cây nhọ nồi và cây ổi trên chuột đái tháo đường týp 2”, *Tạp chí Y học Việt Nam* 372(2), tr. 95-99.
2. Đỗ Thị Trang, **Hà Thị Bích Ngọc**, Nguyễn Văn Mùi, Phan Văn Chi (2010), “Điều tra, nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của một số thực vật Việt Nam lên mô hình chuột đái tháo đường týp 2”, *Tạp chí Y học Việt Nam* 372(2), tr. 100-103.
3. Phương Thị Nhân, Đặng Thanh Thủy, **Hà Thị Bích Ngọc**, Nguyễn Văn Mùi (2010), “Nghiên cứu tác dụng điều hòa lượng đường huyết của cây tầm gửi *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Blume ex Shult.F., diệp hạ châu *Phyllanthus amarus* Schum.et Thonn., *Phyllanthus urinaria* L., lá bàng *Terminalia catappa* L. trên mô hình chuột đái tháo đường týp 2”, *Tạp chí Y học Việt Nam* 372(2), tr. 137-143.
4. **Hà Thị Bích Ngọc**, Trịnh Thị Thu, Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Văn Mùi, Phan Văn Chi (2010), “Nghiên cứu tác dụng hỗ trợ điều hòa lượng đường trong máu của dịch chiết lá thìa canh *Gymnema sylvestre* trên mô hình chuột nhắt gây đái tháo đường týp 2”, *Hội nghị Sinh học phân tử và hóa sinh y học toàn quốc lần thứ II*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 248-252.
5. **Hà Thị Bích Ngọc**, Nguyễn Văn Mùi, Trần Thị Kiều Diệp (2011), “Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhắt đái tháo đường”, *Tạp chí Y học Việt Nam* 384(2), tr. 210-213.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Bùi Thị Bằng, Nguyễn Thượng Dong (2010), “Thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chè đắng”, *Tạp chí Dược liệu* 15(3), tr. 141-148.
2. Tạ Văn Bình (2007), *Những nguyên lý nền tảng bệnh đái tháo đường-tăng glucose máu*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Võ Văn Chi, Nguyễn Công Đức, Bùi Mỹ Linh, Nguyễn Đức Nghĩa (2010), *Cây thuốc và bài thuốc trị bệnh đái tháo đường*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. Nguyễn Thượng Dong (2008), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
5. Đỗ Trung Đàm (2003), *Sử dụng Microsoft- Excel trong thống kê sinh học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
6. Đỗ Trung Đàm (2005), “Tình huống đặc biệt khi sử dụng Microsoft excel trong thống kê sinh học”, *Tạp chí Dược học* (353), tr. 4-7.
7. Đỗ Trung Đàm (2006), “Xây dựng mô hình nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết của thuốc ở động vật có glucose huyết bình thường”, *Tạp chí Dược học* (362), tr. 18-22.
8. Đỗ Trung Đàm, Đỗ Mai Hoa (2007), *Thuốc chữa đái tháo đường*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
9. Đỗ Trung Đàm (2010), “Cách biểu thị liều dùng của các chất chiết được từ dược liệu”, *Tạp chí Dược học* (408), tr. 2-4.
10. Nguyễn Văn Đán, Ngô Ngọc Khuyến (1999), *Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
11. Nguyễn Văn Đâu, Lưu Hoàng Ngọc, Nguyễn Đình Chung (2003), “Nghiên cứu hoạt tính sinh học từ cây chó đẻ thân xanh *Phyllanthus niruri* Linn., Euphorbiaceae”, *Tạp chí Dược học* (9), tr. 13-14.
12. Nguyễn Văn Đâu, Trần Thị Thu Hà (2007), “Nghiên cứu hóa thực vật cây chó đẻ răng cưa *Phyllanthus niruri* L., Euphorbiaceae”, *Tạp chí Dược học* (369), tr. 14-16.

13. Phạm Hữu Điền (2003), “Một số hợp chất thiên nhiên từ thực vật có tác dụng hạ đường huyết”, *Tạp chí Dược học* (7), tr. 10-12.
14. Đào Thị Thanh Hiền, Phạm Thanh Kỳ, Lê Mai Hương (2003), “Nghiên cứu một số tác dụng của lá cây vối *Cleistocalyx operculatus* (Rosb.) Merr.et Perry”, *Tạp chí Dược học* (3), tr. 12-14.
15. Hội Nội tiết và Đái tháo đường Việt Nam (2009), *Khuyến cáo về bệnh đái tháo đường*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
16. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Xuân Thắng (2002), “Tác dụng hạn chế tăng glucose huyết của thân mướp đắng trên một số mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học* (1), tr. 22-25.
17. Phùng Thanh Hương (2010), *Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lãng nước (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.)*, Luận án Tiến sĩ dược học, Đại học Dược, Hà Nội.
18. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Thị Phương Liên, Nguyễn Xuân Thắng (2010), “Tác dụng hạ glucose huyết của diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn. trên chuột nhắt trắng thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học* (405), tr. 30-34.
19. Nguyễn Khang (2002), “Hướng dẫn nghiên cứu cây thuốc của Tổ chức Y học thế giới”, *Tạp chí Dược học* (9), tr. 3-5.
20. Nguyễn Nhược Kim, Hoàng Minh Chung, Dương Đăng Hiền (2010), “Bào chế và đánh giá tác dụng của thuốc tiểu đường Đông Đô trên bệnh nhân đái tháo đường type 2 chưa có biến chứng”, *Tạp chí Dược liệu* 15(5), tr. 322-325.
21. Đỗ Tất Lợi (2006), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
22. Vũ Ngọc Lộ (2005), “Những dược liệu có tác dụng hạ đường huyết và trị tiểu đường”, *Tạp chí Dược học* (353), tr. 7-9.
23. Chu Văn Mẫn (2009), *Tin học trong công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội.
24. Lê Quan Nhiệm, Huỳnh Văn Hóa (2007), *Bào chế và sinh dược học*, Nhà xuất bản Y học, Hồ Chí Minh.

25. Trần Văn Ôn, Phùng Thanh Hương, Đỗ Anh Vũ và cộng sự (2008), “Tác dụng hạ đường huyết của dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz.)R.Br.ex Schult)”, *Tạp chí Dược học* (391), tr. 31-33.
26. Nguyễn Đức Quang (2008), *Bào chế Đông dược*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
27. Đỗ Trung Quân (2006), *Biến chứng bệnh đái tháo đường và điều trị*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
28. Hồ Việt Quý (2002), *Chiết tách, phân chia, xác định các chất bằng dung môi hữu cơ*, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội.
29. Hoàng Văn Thanh, Hoàng Văn Lựu, Chu Đình Kính, Phạm Thị Thanh Mỹ (2008), “Xác định một số hợp chất tách từ rễ cây sắn thuyền (*Syzygium resinsum* (Gagnep.) Merr.et.Perry)”, *Tạp chí Hóa học* 46(5A), tr. 260-264.
30. Phạm Văn Thanh (2001), *Nghiên cứu thuốc điều trị bệnh đái tháo đường từ quả cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.)*, Luận án Tiến sĩ Dược học, Viện Dược liệu, Hà Nội.
31. Trần Đình Thắng, Bùi Quang Chính, Hoàng Văn Lựu, Nguyễn Xuân Dũng (2007), “Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất phenolic từ cây chó đẻ răng cưa *Phyllanthus urinaria* L. ở Việt Nam”, *Tạp chí Dược học* (371), tr. 14-16.
32. Đỗ Thị Minh Thìn (1996), *Nghiên cứu điều trị đái tháo đường không phụ thuộc insulin bằng chế phẩm từ quả mướp đắng và sinh địa*, Luận án Tiến sĩ khoa học Y dược, Học viện Quân y, Hà Nội.
33. Huỳnh Ngọc Thụy, Nguyễn Khắc Quỳnh Cứ, Ngô Văn Thu, P.J.Houghton (2009), “Nghiên cứu các dược liệu có tên Diệp hạ châu (*Phyllanthus* spp.) mọc tại miền Nam Việt Nam”, *Tạp chí Dược liệu* 14(5), tr. 277-281.
34. Nguyễn Văn Tường, Phạm Quốc Bảo (2010), *Hướng dẫn thử nghiệm trên lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
35. Nguyễn Thị Kim Tuyền, Nguyễn Văn Thanh, Hoàng Văn Lựu, Chu Đình Kính (2010), “Tách và xác định cấu trúc một số hợp chất từ nụ và hoa cây vôi *Cleistocalyx operculatus* (Roxb) Merr.,et Perry”, *Tạp chí Dược học* (405), tr. 43-46.
36. Đỗ Quốc Việt, Trần Văn Sung, Nguyễn Thanh Thúy (2006), “Sơ bộ nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của quả chuối hột (*Musa balbisiana*) trên chuột thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học* (361), tr. 8-11.

Tiếng Anh

37. Abesundara K.J.M., Matsuit T., Matsumoto K. (2004), “ α -Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plants extract, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect of rats comparable to the therapeutic drug acarbose”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(9), pp. 2541-2545.
38. Ahmed F., Siddaraju N.S., Urooj A. (2011), “*In vitro* hypoglycemic effects of *Gymnema sylvestre*, *Tinospora cordifolia*, *Eugenia jambolana* and *Aegle marmelos*”, *Journal of Natural Pharmaceuticals* 2(2), pp. 52-55.
39. Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi S., Farhangi A., Verdi A.A., Mofidian S.M.A., Rad B.L. (2007), “Induction of diabetes by streptozotocin insulin rats”, *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(2), pp. 60-64.
40. Al-Achi A. (2008), *An introduce to botanical medicines*, Greenwood publishing group, Westport.
41. Al-Romaiyan A., Liu B., Asare-Anane H., Maity C.R., Chatterjee S.K., Koley N., Biswas T., Chatterji A.K., Huang G.C., Amiel S.A., Persaud S.J., Jones P.M. (2010), “A novel *Gymnema sylvestre* extract stimulates insulin secretion from human islets *invivo* and *invitro*”, *Phytotherapy research* 24(9), pp. 1370-1376.
42. Ali H., Houghton P.J., Soumyanath A. (2006), “ α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*”, *Journal of Ethnopharmacology* 107(3), pp. 449-455.
43. American Diabete Association (2005), *American Diabetes Association Complete Guide To Diabetes*.
44. Anurakkun N.J., Bhandari M.R., Kawabata J. (2007), “ α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*)”, *Food Chemistry* 103(4), pp. 1319-1323.
45. Arnoldi A. (2004), *Functional foods, cardiovascular disease and diabetes*, Woodhead publishing limited, Cambridge.
46. Barnett A.H., Kumar S. (2009), *Obesity and Diabetes*, John Willy&Sons Ltd., West Sussex.
47. Baskaran K., Ahamath B.K., Shanmugasundaram K.P., Shanmugasundaram E.R.B. (1990), “Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-

insulin-independent diabetes mellitus patients”, *Journal of Ethnopharmacology* 30(3), pp. 295- 305.

48. Benalla W., Bellahcen S., Bnouham M. (2010), “Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors”, *Current diabetes reviews* 6(4), pp. 247-254.

49. Bhandari M.R., Anurakkun N.J., Hong G., Kawabata J. (2008), “ α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.)”, *Food Chemistry* 106(1), pp. 247-252.

50. Cetto A.A., Jimenez J.B., Vazquez R.C. (2008), “Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes”, *Journal of Ethnopharmacology* 116(1), pp. 27-32.

51. Chang C.C., Lien Y.C., Liu K.C.S.C, Lee S.S. (2003), “Lignans from *Phyllanthus urinaria* L.”, *Phytochemistry* 63(7), pp. 825-833.

52. Codario R.A. (2011), *Type 2 Diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome*, Humana Press, NewYork.

53. Deeg R., Ziegenhorn J. (1983), “Kinetic Enzymic Method for Automated Determination of Total Cholesterol insulin Serum”, *Clinical Chemistry* 29(10), pp 1798 – 1802.

54. Dham S., Shah V., Hirsch S., Banerji M.A. (2006), “The role of complementary and alternative medicine in diabetes”, *Current Diabetes Reports* 6(3), pp. 251-258.

55. Donnelly R., Horton E. (2005), *Vascular Complications of Diabetes*, Blackwell Publishing, Oxford.

56. Du Z.Y., Liu R.R., Shao W.Y., Mao X.P., Ma L., Gu L.Q., *et al* (2006), “ α -Glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs”, *European Journal of Medicinal Chemistry* 41(2), pp. 213-218.

57. Dung N.T, Bajpai V.K., Yoon J.I, Kang S.C. (2009), “Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr&Perry”, *Food and Chemical Toxicology* 47(2), pp. 449-453.

58. Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C. (2008), “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of

- Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr&Perry buds”, *Food and chemical toxicology* 46(12), pp. 632-629.
59. Editorial (2010), “Raising the priority accorded to diabetes insulin global health and development: A promising response...”, *International Journal of Diabetes Mellitus* 2(3), pp. 139-140.
60. Emmanuel J.C. (2001), *The Clinical of blood*, WHO.
61. Fisher M., McMurray J.J. (2007), *Diabetic Cardiology*, John Wiley&Sons Ltd, West Sussex.
62. Fonseca V. (2008), *Therapeutic of Strategies in Metabolic Syndrome*, Clinical publishing, Oxford.
63. Gao H., Huang Y.N., Gao B., Xu P.Y., Inagaki C., Kawabata J. (2008), “ α -Glucosidase insulin effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L.”, *Food Chemistry* 106(3), pp. 1195-1201.
64. Gao H., Huang Y.N., Gao B., Li P., Inagaki C., Kawabata J. (2008), “Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees”, *Food Chemistry* 108(3), pp. 965-972.
65. Hanas R. (2007), *Type 1 Diabetes insulin children, adolescents and young adults*, Class Publishing, London.
66. Hansen B., Shafrir E. (2004), *Insulin resistance and insulin resistance syndrome*, Taylor&Francis, London.
67. Hiroyuki A., Yoko A., Hideki S., Tamiko K., Miyoe K.(1995), “NMR Spectra of Triterpenoids. III. Oleanenes and Migrated Oleanenes”, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 43 (2), pp. 198-203.
68. Hod M., Jovanovic L.G., Dizenzo G.C.D., Leiva A.D., Langer O. (2008), *Textbook of Diabetes and Pregancy 2nd Edition*, Informa Healthcare, UK.
69. Huang H.-Y., Niu J.-L., Zhao L.-M., Lu Y.-H. (2011), “Reversal effect of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone on multi drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU”, *Phytomedicine*, Epub ahead of print.

70. Jabbour S., Stephens E.A, Hirsch I.B., Garg S., Goldstein B.J, Riddle M.C. (2008), *Type 1 Diabetes In Adults Principles and Practice*, Informa healthcare, NewYork.
71. Jung M., Park M.S., Lee H.C., Kang Y.H., Kang E.S, Kim S.K. (2006), “Antidiabetic Angents from Medicinal Plants”, *Current Medicinal Chemistry* 13(10), pp. 1203-1218.
72. Kohei K., Yoshioka K., Saiki Y., Ikuta A., Satake T. (1997), “Triterpenoids and flavonoids from *Paneonia lactiflora*”, *Phytochemistry* 44(1), pp. 141-144.
73. Kumar S., O’Rahilly S. (2005), *Insulin resistance-Insulin action and its disturbances insulin disease*, John Wiley&Sons Ltd, West Sussex.
74. Kumar S., Narwal S., Kumar V., Prakash O. (2011), “ α -Glucosidase inhibitor from plants: A natural approach to treat diabetes”, *Pharmacognosy Review* 5(9), pp. 19-29.
75. Lam S.H., Chen J.M., Kang C.J., Chen C.H., Lee S.S. (2008), “ α -Glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*”, *Phytochemistry* 69(5), pp.1173-1178.
76. Lau J.F., Smith D.A. (2009), “Advanced Lipoprotein Testing: Recommendations Based on Current Evidence”, *Endocrinology and Metabolism Clinics* 38(1), pp.1-31.
77. Lebovitz H.E. (1997), “ α -glucosidase inhibitor”, *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 26(3), pp. 539-551.
78. Luo H., Imoto T., Hiji Y. (2001), “Inhibitory effect of voglibose and gymnemic acid on maltose absorption *invivo*”, *World Journal of Gastroenterology* 7(2), pp. 270-274.
79. Luo J.G., Ma L., Kong L.Y. (2008), “New triterpenoid saponins with strong α -glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16(6), pp. 2912-2120.
80. Mai TT, Chuyen NV (2007), “Anti-hyperglycemic activity of aqueous extract from flower buds of *Cleitocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71(1), pp. 69-76.

81. Mai TT, Fumie N., Chuyen N.V. (2009), “Antioxidant activities and hypolipidemic effects of an aqueous extract from flower buds of *Cleitocalyx operculatus* (Roxb.) Merr&Perry”, *Journal of food biochemistry* 33(6), pp. 790-807.
82. Mai T.T., Yamaguchi K., Yamanaka M., Lam N.T., Otsuka Y., Chuyen N.V. (2010), “Protective and anticataract effects of the aqueous extract of *Cleistocalyx operculatus* flower buds on beta-cell of streptozocin-diabetic rats”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58(7), pp. 4162-4168.
83. McCabe B.J., Frankel E.H., Wolfe J.J. (2003), *Handbook of food-drug interactions*, CRC Press LLC, NewYork.
84. McGowan M.W (1983), “A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides”, *Clinical Chemistry* 29(3), pp 538 – 542.
85. Meireles M.A.A. (2008), *Extracing Bioactive Compounds For Food Products: Theory and Applications*, CRC Press, NewYork.
86. Min B.-S., Thu C.V., Dat N.T., Dang N.H., Jang H.-S., Hung T.M. (2008), “Antioxidative flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* buds”, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 56(12), pp. 1725-1728.
87. Min B.S., Cuong T.D, Lee J.S., Woo M.H., Hung T.M (2010), “Flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* Buds and their Cytotoxic Activity”, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31(8), pp. 2392-2394.
88. Mitchell T.N., Costisella B. (2007), *NMR-From spectra to structures: An experimental approach*, Springer, NewYork.
89. Murakami N., Murakami T., Kadoya M. (1996), “New hypoglycemic constituents insulin “gymnemic acid” from *Gymnema sylvestre*”, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 44(2), pp. 469-471.
90. Myatake K., Takenaka S., Fujimoto T., Kensho G., Upadhaya A., Kirihata M., Ichimoto I., Nakano Y (1993), “Isolation of conduritol A from *Gymnema sylvestre* and its effect against intestinal glucose absorption insulin rats”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57(12), pp. 2184-2185.
91. National Medicinal Plants Broad (2008), *Agro-techiques of selected medicinal plants*, Teri Press, New Dehli.

92. Nishimura K., Miyase T., Noguchi H. (1999), "Triterpenoid saponins from *Ilex kuduncha*", *Journal of Natural Products* 62(8), pp. 1128-1133.
93. Ouyang M.A., Wang H.Q., Chen Z.L., Yang C.R. (1996), "Triterpenoid glycosydes from *Ilex kuduncha*", *Phytochemistry* 43(2), pp. 443-445.
94. Ouyang M.A., Yang C.R., Wu Z.J. (2001), "Triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex kuduncha*", *Journal of Asian Natural Products Research* 3(1), pp. 31-42.
95. Pathak Y. (2010), *Handbook of Nutraceuticals Volume 1 Ingredients, Formulations and Applications*, CRC Press, Boca Raton.
96. Peng S., Zhao M. (2009), *Pharmaceutical Bioassays-Methods and Applications*, A John Wiley&Sons Inc, New Jersey.
97. Persaud S.J., Majed H.Al., Raman A., Jones J.M. (1999), "*Gymnema sylvestre* stimulates insulin release *in vitro* by increased membrane permeability", *Journal of Endocrinology* 163(2), pp. 207-212.
98. Pirker K.F., Goodman B.A. (2010), "Caffeoylquinic acid derived free radicals identified during antioxidant reactions of bitter tea (*Ilex latifolia* and *Ilex kuduncha*)", *Journal of Functional Foods* 1(3), pp. 262-268.
99. Poresky L. (2010), *Principles of Diabetes Mellitus*, Springer, NewYork.
100. Proetzel G., Wiles M.V. (2010), *Mouse models for Drug Discovery-Methods and Protocols*, Humana Press, NewYork.
101. Raymond A., Mehdi M. (2008), *Modelling 1H NMR Spectra of Organic Compounds: Theory, Applications and NMR Prediction Software*, Wiley, NewYork.
102. Sabu M.C., Kuttan R. (2002), "Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property", *Journal of Ethnopharmacology* 81(2), pp. 155-160.
103. Salem M.M., Werbovetz K.A. (2005), "Antiprotozoal Compounds from *Psoralea polydenius*", *Journal of Natural Products* 68(1), pp. 108-111.
104. Saltiel A.R., Pessin J.E. (2007), *Mechanisms of Insulin Action*, Springer Science & Business Media, NewYork.
105. Sathya S., Kokilavani R., Gurusamy K. (2008), "Hypoglycemic effect of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br leaf in normal and alloxan induced diabetic rats", *Ancient Science of Life* 28(2), pp. 12-14.

106. Savage D.B, Semple R.K, Chatterjee V.K.K, Wales J.K.H, Ross R.J.M, O’Rahilly S. (2007), “A Clinical Approach to Severe Insulin Resistance”, *Congenital Endocrinopathies-New Insights into Endocrine Diseases and Diabetes*, Vol 11, pp.122-132.
107. Sawant S.P., Dnyanmote A.V., Mitra M.S., Chilakapati J., Warbritton A., Latendresse J.R, Mehendale H.M. (2006), “Protective Effect of Type 2 Diabetes on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Male Swiss Webster Mice”, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316 (2), pp. 507-519.
108. Shashi B., Mahato, Asish P.K. (1994), “¹³C-NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features”, *Phytochemistry* 39(6), pp. 1517-1575.
109. Shaw K.M., Cummings M.H. (2005), *Diabetes Chronic Complications*, John Wiley&Sons Ltd, England
110. Silink M., Kida K., Rosenbloom A.L. (2003), *Type 2 Diabetes in Childhood and Adolescence*, Martin Dunitz, London.
111. Srivastava R., Shaw A.K., Kulshreshtha D.K. (1995), “Triterpenoids and chalcone from *Syzyum samarangense*”, *Phytochemistry* 38(3), pp. 687-689.
112. Stocker C. (2009), *Type 2 Diabetes Methods and Protocols*, Humana Press, New York.
113. Sugihara Y., Nojima H., Matsuda H., et al (2000), “Antihyperglycemic effects of gymnemic acid IV, a compound derived from *Gymnema sylvestre* leaves in streptozotocin-diabetic mice”, *Journal of Asian Natural Products Research* 2(4), pp. 321–327.
114. Tadera K., Minami Y., Takamastu K., Matsuoka T.. (2006), “Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids”, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52(2), pp. 149-153.
115. Tringali C. (2000), *Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation, Characterization and Biological Properties*, Taylor&Francis, London.
116. Wehmeier U.F., Piepersberg W. (2004), “Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose”, *Microbiology and Biotechnology* 63(6), pp. 613-625.

117. Wen Y.X., Liang X.Y., Cheng G.R., Wu N., Kang W.J., Zheng Q.T., Lu Y. (1999), "Structural identification of kudinchenin I", *Acta Botanica Sinica* 41(2), pp. 206-208.
118. Williams L., Wilkins (2004), *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, Springer, New York.
119. Ye C.-L.; Lu Y.-H.; Wei D.-Z. (2004), "Flavonoids from *Cleistocalyx operculatus*", *Phytochemistry* 65(4), pp. 445-447.
120. Ye C.-L., Lu Y.-H. , Li X.-D., Wei D.-Z. (2005), "HPLC analysis of a bioactive chalcone and triterpen in the buds of *Cleistocalyx operculatus*", *South African Journal of Botany* 71(3&4), pp.312-315.
121. Yogeewari P., Sriram D. (2005), "Bentunilic acid and its derivatives: A review on their biological properties", *Current Medicinal Chemistry* 12(6), pp.657-666.
122. Yoriko D. , Miyazaki K. (2010), "Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of Guava leaf extract" , *Journal of Nutrition and Metabolism* 7(1), pp. 9- 13.
123. Zeitler P.S., Nadeau K.J. (2008), *Insulin Resistance Childhood Precursors and Adult Disease*, Humana Press, Totowa.
124. Zhang L.Z., Guo Y.Z., Tu G.Z., Guo W.B., Miao F. (2000), "Studies on chemical constituents of *Phyllanthus urinaria* L.", *The China Journal of Chinese material medica* 25(10), pp. 615-617.
125. Zhou S., Xu C., Zhou N., Huang Y., Huang L., Chen X., Hu Y., Liao Y. (1997), "Mechanism of protective action of *Phyllanthus urnaria* L. against injuries of liver cells", *The China Journal of Chinese material medica* 22(2), pp. 109-111.
126. Zuo W.J., Zeng Y.M., Hu Y., Meng H., Wang Z.H., Wang J.H. (2009), "A new triterpene saponin from the leaves of *Ilex kudincha*", *Journal Chinese Chemical Letters* 20(11), pp. 1331-1334.

MỤC LỤC

Trang

TRANG PHỤ BÌA	
LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
MỤC LỤC	
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC CÁC BẢNG	
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG	4
1.1.1. Khái niệm và phân loại bệnh ĐTD	4
<i>1.1.1.1. Khái niệm</i>	4
<i>1.1.1.2. Phân loại</i>	5
1.1.2. Bệnh ĐTD type 2 và tính kháng insulin	7
<i>1.1.2.1. Cơ chế tác dụng của insulin</i>	7
<i>1.1.2.2. Tính kháng insulin</i>	10
1.1.3. Biến chứng bệnh đái tháo đường	12
1.1.4. Tình hình bệnh đái tháo đường trên thế giới và tại Việt Nam	14
<i>1.1.4.1. Tình hình bệnh ĐTD trên thế giới</i>	14
<i>1.1.4.2. Tình hình bệnh ĐTD tại Việt Nam</i>	15
1.2. SỬ DỤNG THUỐC VÀ THẢO DƯỢC TRONG ĐIỀU TRỊ ĐÁI THÁO ĐƯỜNG	15
1.2.1. Sử dụng thuốc trong điều trị đái tháo đường	16
1.2.2. Nghiên cứu điều trị ĐTD bằng thảo dược trên thế giới	19
1.2.3. Nghiên cứu điều trị ĐTD từ nguồn thực vật tại Việt Nam	22
1.3. HOẠT CHẤT CHIẾT XUẤT TỪ THỰC VẬT CÓ KHẢ NĂNG HẠ ĐƯỜNG HUYẾT DO ỨC CHẾ ENZYM α-GLUCOSIDASE	24
1.3.1. Cơ chế tác dụng của chất gây ức chế enzym α-glucosidase	24

1.3.2. Tổng quan các dịch chiết thực vật và hoạt chất sinh học có khả năng ức chế α -glucosidase.....	26
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
2.1. NGUYÊN LIỆU	35
2.1.1. Nguyên liệu và đối tượng nghiên cứu	35
2.1.2. Hóa chất và thiết bị thí nghiệm	36
2.1.2.1. Hóa chất	36
2.1.2.2. Thiết bị thí nghiệm	37
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.2.1. Phương pháp chiết xuất	39
2.2.1.1. Xử lý mẫu	39
2.2.1.2. Chiết mẫu bằng nước nóng	39
2.2.1.3. Chiết mẫu bằng cồn 60 ^o	39
2.2.1.4. Chiết thu phân đoạn trong các dung môi có độ phân cực tăng dần ..	39
2.2.2. Phương pháp gây chuột nhắt ĐTD type 2	40
2.2.2.1. Nuôi chuột nhắt béo bằng chế độ ăn giàu chất béo (HFD- high fat diet)	41
2.2.2.2. Gây chuột nhắt ĐTD type 2 thực nghiệm	41
2.2.2.3. Định lượng đường huyết.....	42
2.2.2.4. Nghiệm pháp dung nạp glucose.....	42
2.2.2.5. Định lượng insulin máu chuột bằng kỹ thuật ELISA	43
2.2.3. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết trên chuột nhắt ĐTD type 2.....	43
2.2.3.1. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao thô 24 mẫu thực vật trên chuột nhắt ĐTD type 2	43
2.2.3.2. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn mẫu lá vối, lá chè đắng trên chuột nhắt ĐTD type 2	45
2.2.3.3. Khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhắt ĐTD type 2	45
2.2.4. Xác định chỉ số hóa sinh.....	45
2.2.4.1. GOT (glutamate oxalo acetate transaminase)	45
2.2.4.2. GPT (glutamate pyruvate transaminase).....	46
2.2.4.3. Cholesterol.....	46

2.2.4.4. Triglyceride	46
2.2.4.5. HDLc, LDLc	46
2.2.5. Phương pháp làm tiêu bản đúc cắt gan chuột.....	47
2.2.6. Xác định khả năng ức chế enzym α -glucosidase	48
2.2.7. Xác định thành phần hóa học một số mẫu thực vật	49
2.2.6.1. Khảo sát sơ bộ thành phần hóa học trong một số cao thô thực vật ...	49
2.2.6.2. Phương pháp phân lập các chất	51
2.2.6.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học	51
2.2.8. Bào chế chế phẩm Thivoda	53
2.2.9. Xác định độc tính cấp của chế phẩm Thivoda	55
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu	56
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	57
3.1. CHIẾT XUẤT BẰNG NƯỚC NÓNG VÀ CỒN 60⁰ CÁC MẪU THỰC VẬT	57
3.2. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ĐIỀU HÒA ĐƯỜNG HUYẾT CỦA DỊCH CHIẾT THỰC VẬT TRÊN CHUỘT NHẮT ĐTĐ TYPE 2	59
3.2.1. Gây chuột nhắt ĐTĐ type 2	59
3.2.1.1. Kết quả nuôi chuột nhắt béo	59
3.2.1.2. Nồng độ đường huyết của chuột nhắt béo sau khi tiêm STZ	62
3.2.1.3. Định lượng insulin trong máu chuột nhắt béo tiêm STZ.....	63
3.2.1.4. Nghiệm pháp dung nạp glucose.....	65
3.2.2. Sàng lọc các mẫu thực vật có khả năng hạ đường huyết	66
3.2.2.1. Đợt I.....	66
3.2.2.2. Đợt II	67
3.2.2.3. Đợt III	68
3.2.2.4. Đợt IV.....	69
3.3. NGHIÊN CỨU CAO CHIẾT MẪU LÁ VỎI VÀ LÁ CHÈ ĐẮNG	71
3.3.1. Ảnh hưởng của cao nước lá vối, lá chè đấng lên hình thái tế bào và chức năng gan chuột	72
3.3.1.1. Các chỉ số GOT, GPT máu chuột.....	72
3.3.1.2. Ảnh hưởng lên cấu trúc mô gan.....	73
3.3.2. Cao chiết phân đoạn lá vối.....	74

3.3.2.1. Khối lượng cao chiết phân đoạn lá vối.....	74
3.3.2.2. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của các cao chiết phân đoạn lá vối.....	75
3.3.2.3. Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của các cao phân đoạn.....	76
3.3.2.4. Phân lập, xác định cấu trúc các hợp chất từ cao phân đoạn lá vối có hoạt tính hạ đường huyết tốt nhất.....	77
3.3.2.5. Hoạt tính sinh học của các hợp chất đã phân lập từ lá vối.....	89
3.3.3. Cao chiết phân đoạn lá chè đắng.....	91
3.3.3.1. Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết phân đoạn lá chè đắng.....	92
3.3.3.2. Thành phần hóa học của phân đoạn n-hexane lá chè đắng.....	93
3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase.....	97
3.4. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VÀ TÁC DỤNG CỦA CHẾ PHẨM THIVODA.....	99
3.4.1. Chọn lọc chế phẩm nguồn gốc từ thực vật có khả năng hạ đường huyết..	99
3.4.1.1. Định tính thành phần hóa học có trong 5 mẫu thực vật.....	101
3.4.1.2. Tác dụng hạ đường huyết của cao tổng nước và cao tổng cồn.....	102
3.4.2. Bào chế và nghiên cứu chế phẩm Thivoda có tác dụng điều hòa đường huyết trên chuột nhất đái tháo đường type 2.....	104
3.4.2.1. Bào chế chế phẩm Thivoda.....	104
3.4.2.2. Nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của chế phẩm Thivoda trên chuột nhất ĐTĐ type 2.....	105
3.4.2.3. Cơ chế hạ đường huyết.....	106
3.4.2.4. Nghiên cứu độc tính cấp của chế phẩm Thivoda.....	109
KẾT LUẬN.....	111
ĐỀ NGHỊ.....	113
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	115
<i>Tiếng Việt.....</i>	<i>115</i>
<i>Tiếng Anh.....</i>	<i>118</i>
PHỤ LỤC	