

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC LÁ HẢI KIM SA (*LIGODIUM JAPONICUM*) VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ỨNG CHẾ ENZYME ANGIOTENSIN-CONVERTING, ENZYME LIPASE CỦA CAO LÁ HẢI KIM SA

Lê Nhân Tuấn¹
Nguyễn Kim Oanh¹, Trần Lê Phương Linh¹
Đoàn Phước Cường¹, Nguyễn Thị Ảnh¹
Nguyễn Hồng Tiến², Hồ Thiên Phú²
Huỳnh Quốc Bảo², Bùi Thanh Phong^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát thành phần hóa học có trong lá Hải kim sa (*Ligodium japonicum*) và hoạt tính ức chế enzyme angiotensin-converting, enzyme lipase từ các cao phân đoạn của Hải kim sa.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu xác định các hợp chất có trong dược liệu lá Hải kim sa bằng phương pháp định tính thành phần hóa học. Sử dụng phương pháp chiết cao, chiết phân đoạn và đánh giá hoạt tính khả năng ức chế các enzyme (angiotensin-converting enzyme và lipase) cao toàn phần, cao phân đoạn n-Hexan, chloroform, n-Butanol và cao nước từ lá Hải kim sa ở mức độ *in vitro*.

Kết quả: Thành phần hóa học của lá Hải kim sa gồm các nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, coumarin, saponin, antranoid, triterpenoid, tanin, acid hữu cơ, phenol, đường khử, polisaccharid, carotenoid. Hiệu quả ức chế angiotensin-converting enzyme cao nhất ở cao chloroform với IC_{50} là 139,49 ($\mu\text{g/ml}$) và hoạt tính ức chế lipase cao nhất là ở cao n-Butanol với IC_{50} là 252,54 ($\mu\text{g/ml}$).

Kết luận: Lá Hải kim sa chứa nhiều hợp chất hóa học có hoạt tính sinh học. Cao chiết lá Hải kim sa có tiềm năng trong việc ức chế angiotensin-converting enzyme và lipase tụy *in vitro*.

Từ khóa: Hải kim sa, *Ligodium japonicum*, tăng huyết áp, béo phì, lipase tụy.

ABSTRACT

Objectives: Identify the chemical components in *Lygodium japonicum* leaves, along with investigating the inhibitory activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) and lipase enzyme from the extracts of *Lygodium japonicum*.

Subjects and methods: This study determines the compounds contained in *Lygodium japonicum* leaves by using qualitative chemical composition methods. In addition, the study used the method of extracting, shaking fractions, and measuring activity to evaluate the ability to inhibit enzymes (ACE and Lipase) from total extract, fractional n-hexane extract, chloroform, n-butanol, and aqueous extract from *Lygodium japonicum* leaves at *in vitro* level.

Results: The chemical composition of *Lygodium japonicum* leaves includes alkaloids, flavonoids, coumarin, saponins, antranoids, triterpenoids, tannins, organic acids, phenol, reducing sugars, polysaccharides, and carotenoids. The highest ACE inhibitory effect was in chloroform extract with IC_{50} of 139,49 ($\mu\text{g/ml}$), and the highest lipase inhibitory activity was in n-butanol extract with IC_{50} of 252,54 ($\mu\text{g/ml}$).

Conclusions: *Lygodium japonicum* leaves contain many biologically active chemical compounds. Besides, *Lygodium japonicum* leaf extract can potentially inhibit ACE and pancreatic lipase *in vitro*.

Keywords: *Ligodium japonicum*, hypertension, obesity, pancreatic Lipase.

Chịu trách nhiệm nội dung: Bùi Thanh Phong, Email: phongbui0407@gmail.com

Ngày nhận bài: 14/01/2024; mời phản biện khoa học: 01/2024; chấp nhận đăng: 19/11/2024.

¹Trường Đại học quốc tế Hồng Bàng.

²Trường THPT chuyên Lê Quý Đôn, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng huyết áp trong thời gian dài có thể dẫn đến các biến chứng như suy thận, nhồi máu cơ tim, đột quỵ não... Nguyên nhân gây nên tình trạng tăng huyết áp có thể do hoạt động bất thường của hệ thống renin-angiotensin-aldosterone. Điều trị tăng huyết áp bằng sử dụng enzyme ức chế men chuyển angiotensin-converting enzyme (ACE) nhằm ức chế sự hình thành hormon angiotensin II, góp phần làm giảm huyết áp [1]. Một vấn đề khá nghiêm trọng với sức khỏe con người, nhất là người lớn tuổi và những người có chế độ ăn quá giàu năng lượng dẫn đến thừa cân hoặc béo phì. Béo phì có liên quan đến các hội chứng chuyển hóa, như đái tháo đường, bệnh tim mạch và nhiều bệnh khác. Theo nghiên cứu của S Cai và cộng sự, ở người, lipase tụy đóng vai trò quan trọng trong việc phân cắt chất béo trung tính thành glycerol và acid béo. Các chất ức chế lipase như orlistat đóng vai trò quan trọng trong điều trị béo phì [2].

Hải kim sa (còn gọi là cây Bồng bong) có tên khoa học là *Ligodium japonium L.*, thuộc họ *Ligodiaceae*, thường mọc hoang ở các bụi rậm và ven rừng. Hải kim sa là loài cây thân leo, trên bề mặt mép lá có nhiều bào tử màu vàng nâu hoặc màu vàng nhạt, vách bào tử mang những chấm tròn. Bộ phận sử dụng làm thuốc thường là toàn cây và bào tử, do chứa nhiều phenolic, flavonoid, polisaccharid [3, 4]. Theo các tài liệu y học cổ truyền, Hải kim sa có tác dụng trị phong thấp, giải độc, trị tiểu đường, viêm gan, sỏi đường tiểu, sỏi mật [3]. Hải kim sa chứa chủ yếu các hợp chất alkaloid và triterpenoid loại serratane; dược tính chủ yếu là ức chế acetylcholinesterase, gây độc tế bào và chống viêm [5]. Theo kinh nghiệm dân gian, Hải kim sa cũng được sử dụng cho điều trị tăng huyết áp và béo phì.

Cho đến nay, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây Hải kim sa ở Việt Nam vẫn chưa được làm rõ. Hơn nữa, cây Hải Kim Sa mọc hoang khá nhiều ở Việt Nam, nên việc nghiên cứu và ứng dụng loài này trong y học là một hướng nghiên cứu rất tiềm năng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm định tính thành phần sơ bộ hóa thực vật, khảo sát khả năng ức chế men chuyển ACE và lipase của cao lá Hải kim sa (*Ligodium japonicum*), hướng tới các nghiên cứu ứng dụng dược liệu này trong điều trị tăng huyết áp và béo phì.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Lá Hải kim sa (*Ligodium japonicum*) thu hái tại Long An vào tháng 10/2023. Lá được phơi khô, xay nhuyễn, chuẩn bị cho quá trình chiết xuất.

- Các hóa chất ACE, hippuryl-histidyl-leucine (HHL), lipase từ tụy lợn, p-nitrophenyl butyrate (p-NPB), captopril (chứng dương hoạt tính ức chế ACE), orlistat (chứng dương hoạt tính ức chế lipase). Các hóa chất được cung cấp từ hãng Sigma, đạt tiêu chuẩn nghiên cứu.

- Các dung môi (ethanol, n-Hexan, chloroform, n-Butanol...) khai thác từ hãng Fisher và một số hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát các thành phần hóa học của lá Hải kim sa:

+ Phương pháp chiết cao theo Dược điển Việt Nam V và Đại học Romania cải tiến [6]. Theo đó, 20g bột dược liệu chiết bằng ether ethylic trong Soxhlet thu được dịch chiết ether. Sau đó, bã dược liệu được tiếp tục chiết bằng ethanol 96% trong erlen với sinh hàn đun hồi lưu, thu được dịch chiết cồn. Bã dược liệu sau khi chiết với cồn tiếp tục đem chiết nóng với nước trong erlen trên bếp cách thủy, thu được dịch nước. Một phần dịch chiết cồn, nước đem thủy phân bằng HCl 10% và chiết lại bằng ether ethylic, lần lượt thu được dịch thủy phân cồn, nước. Tất cả dịch chiết được sử dụng để xác định thành phần hóa học thực vật Hải kim sa [7].

+ Thành phần hóa học của dược liệu (lá Hải kim sa) được xác định bằng các phương pháp của Ciulei và cộng sự (1982): phát hiện alkaloid bằng phản ứng với thuốc thử Dragendorff; phát hiện flavonoid bằng phản ứng Cyanidin; phát hiện coumarin bằng phản ứng đóng mở vòng lacton; phát hiện saponin bằng phản ứng tạo bọt; phát hiện antranoid bằng phản ứng Borntraeger; phát hiện tanin bằng phản ứng với thuốc thử gelatin muối; phát hiện triterpenoid bằng thử nghiệm Salkowski; phát hiện acid hữu cơ bằng phản ứng với thuốc thử Na_2CO_3 ; phát hiện phenol bằng phản ứng với thuốc thử NaOH; phát hiện đường khử bằng phản ứng với thuốc thử Fehling; phát hiện carotenoid bằng phản ứng với thuốc thử H_2SO_4 đậm đặc; phát hiện polisaccharid bằng phản ứng với thuốc thử lugol; phát hiện chất béo bằng phản ứng tạo vết.

- Phương pháp chiết xuất cao tổng và các cao phân đoạn: lá Hải kim sa thu hoạch, làm sạch, cắt nhỏ, phơi khô và xay nhuyễn. Chiết ngâm kiệt dược liệu bằng dung môi ethanol 96% với tỉ lệ 1:25 (w/v) thu được dịch chiết. Sau đó, lấy dịch chiết cô đặc lại, được cao toàn phần. Lấy một lượng cao toàn phần hòa tan vào nước cất, lần lượt chiết phân đoạn với các dung môi là n-Hexan, chloroform, n-Butanol thu được các cao chiết là cao HE, CF,

BU. Dịch nước còn lại là cao nước (cao WA). Tiến hành cô đặc các cao và chuẩn bị khảo sát hoạt tính sinh học có khả năng ức chế các enzyme ACE và lipase tụy [8].

- Phương pháp khảo sát hoạt tính ức chế ACE *in vitro* theo D.H. Ngo và cộng sự (2014): lấy 50 µl cao chiết thêm vào 50 µl ACE (25 mU/ml) đã được hòa tan trước đó trong dung dịch đệm Natri-borat 50 nM ở pH 8,3 có chứa NaCl 0,5M; ủ 10 phút ở 37°C. Sau đó, cho thêm 150 µl cơ chất HHL 8,3 mM và ủ ở 37°C trong 30 phút; dừng phản ứng bằng 250 µl HCl 1M. Tiếp đến, lấy 500 µl ethyl acetate cho vào hỗn hợp trên, trộn đều và li tâm 3.000 rpm trong 10 phút, thu được hippuric acid. Hút 200 µl lớp ethyl acetate có hippuric acid trên bề mặt, sấy khô ở 60°C trong 30 phút, hòa tan với 2 ml nước cất. Đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 228 nm. Tiến hành song song đánh giá hiệu quả trong thí nghiệm này với đối chứng dương là captopril. Hoạt tính ức chế ACE được tính theo công thức sau:

$$I\% = [(A-B)/A] \times 100\%.$$

Trong đó: A là độ hấp thụ của dung dịch blank; B là độ hấp thụ của dung dịch mẫu [9].

- Phương pháp khảo sát hoạt tính ức chế lipase tụy của cao chiết *L. japonicum* theo Kwon và cộng sự có sửa đổi: hỗn hợp gồm 50 µl dịch cao chiết, 50 µl dung dịch enzyme lipase tụy (1,0 U/ml) và 50 µl dung dịch đệm Natri phosphate 100 mM (pH 6,8) trộn với nhau và ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau phản ứng, thêm 100 µl dung dịch p-NPB 5 mM trong dung dịch đệm Natri phosphate và tiến hành phản ứng 10 phút. Sau đó, thêm vào 0,75 ml Na₂CO₃ (100 mM) để dừng phản ứng. Mẫu được đo độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm bằng máy đo quang phổ. Hoạt tính ức chế enzyme lipase tụy tính theo công thức:

$$I\% = [(A-B)/A] \times 100\%.$$

Trong đó: A là độ hấp thụ của dung dịch blank; B là độ hấp thụ của dung dịch mẫu [10].

- Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm exel. Đầu tiên là xây dựng phương trình tương quan giữa tỉ lệ ức chế và nồng độ cao chiết theo hàm logarit là $y = a \cdot \ln(x) + b$. Hàm số này được xây dựng khi đo tỉ lệ ức chế enzyme của một dãy 5 nồng độ khác nhau của các mẫu cao chiết. Sau khi có phương trình tương quan, cho $y = 50$ và suy ra giá trị IC₅₀ từ phương trình này. Các chất đối chứng như captopril (chứng dương hoạt tính ức chế ACE), orlistat (chứng dương hoạt tính ức chế lipase) cũng được xác định IC₅₀ như các cao chiết.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thành phần hóa học của lá Hải kim sa

Bảng 1. Thành phần hóa học của lá Hải kim sa (*Ligodium japonicum*)

Chất khảo sát	Kết quả
Alkaloid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Flavonoid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Coumarin	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Saponin	Nhóm hợp chất xuất hiện nhiều, phản ứng định tính có kết quả rất rõ ràng
Antranoid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện nhưng yếu
Triterpenoid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Tanin	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Acid hữu cơ	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Phenol	Nhóm hợp chất xuất hiện nhiều, phản ứng định tính có kết quả rất rõ ràng
Đường khử	Nhóm hợp chất xuất hiện nhiều, phản ứng định tính có kết quả rất rõ ràng
Polisaccharid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện
Chất béo	Nhóm hợp chất không có mặt, không có phản ứng dương tính
Carotenoid	Nhóm hợp chất có mặt, phản ứng định tính xuất hiện nhưng yếu

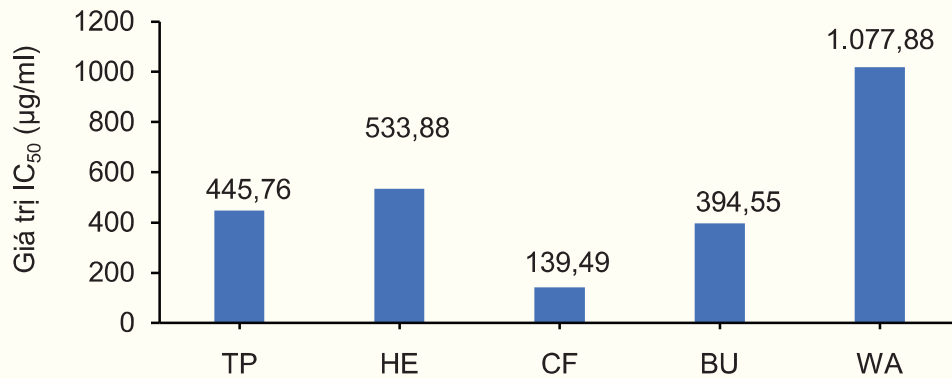
3.2. Kết quả chiết cao

- Từ 500g dược liệu chiết với 10 lít cồn 96% thu được 50,83g cao toàn phần.

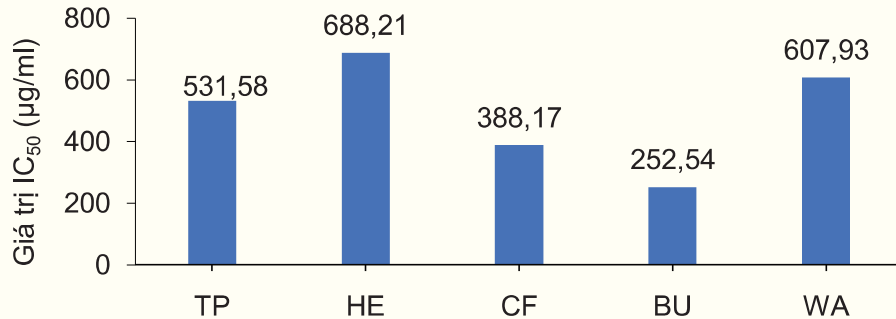
- Lấy 18g cao toàn phần hòa với nước để chiết phân đoạn lần lượt với HE, CF, BU cho ra được 4,88g cao HE; 0,96g cao CF; 2,1g cao BU; 9,8g cao WA.

3.3. Hoạt tính ức chế ACE

Biểu đồ 1 cho thấy, cao toàn phần của lá Hải kim sa thể hiện hoạt tính ức chế ACE với IC₅₀ là 445,76 (µg/ml). Trong các cao phân đoạn, cao CF thể hiện hoạt tính ức chế ACE cao nhất với IC₅₀ là 139,49 (µg/ml), kế tiếp là cao BU, cao HE và thấp nhất là dịch nước còn lại.



Biểu đồ 1. Hoạt tính ức chế ACE của các cao chiết từ lá Hải kim sa.



Biểu đồ 2. Hoạt tính ức chế lipase của các cao chiết từ lá Hải kim sa.

3.4. Hoạt tính ức chế lipase

Biểu đồ 2 cho thấy, cao toàn phần và các cao phân đoạn của lá Hải kim sa đều có hoạt tính ức chế enzyme lipase. Lá Hải kim sa có chứa nhiều saponin, flavonoid, triterpenoid, alkaloid là những chất có khả năng ức chế enzyme lipase. Trong số các cao phân đoạn, cao BU có hoạt tính ức chế lipase cao nhất với giá trị IC₅₀ là 252,54 (µg/ml), trong khi chất đối chứng orlistat có giá trị IC₅₀ là 197,63 (µg/ml).

4. BÀN LUẬN

Đối chiếu với các tài liệu đã công bố, chúng tôi thấy thành phần hóa học của *Ligodium japonicum* xác định trong nghiên cứu này cũng tương tự các loài cùng chi *Ligodium*. Cụ thể như: *Ligodium flexuosum* chứa nhiều hợp chất alkaloid, flavonoid, saponin, coumarin [11]; *Ligodium venustum* chứa nhiều hợp chất phenol, tannin, flavonoid, alkaloid [12]; *Ligodium lanceolatum* chứa nhiều hợp chất cinnamic acid, flavonol, benzoic acid, catechin, tannin [13]... Những kết quả trên cho thấy *Ligodium japonicum* là một dược liệu giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học, nhiều tiềm năng để nghiên cứu khai thác, ứng dụng trong lĩnh vực điều trị bệnh lí cho con người.

Kết quả nghiên cứu khả năng ức chế ACE phù hợp với những phân tích về thành phần hóa học của Hải kim sa, các nhóm hợp chất có hoạt tính

cao, hàm lượng nhiều là alkaloid và saponin đều nằm chủ yếu ở hai cao chiết CF và BU nên hai cao này có hoạt tính ức chế ACE cao nhất [14]. So với chứng dương captopril (IC₅₀ là 16,07 nM) thì hoạt tính của các cao chiết đều thấp hơn.

Cao BU của Hải kim sa ức chế lipase mạnh tương tự như những nghiên cứu trên một số dược liệu khác về hoạt tính ức chế lipase, trong đó, ức chế cao nhất là cao butanol (như ở cây Bứa - *Garcinia atroviridis*) [15], *Bauhinia forficata* [16]. Có thể thấy rằng, cao BU có tiềm năng cao trong việc làm chế phẩm hỗ trợ điều trị béo phì và giảm thiểu các tác dụng không mong muốn. Cao BU có tiềm năng để sản xuất ra các chế phẩm có khả năng hỗ trợ điều trị béo phì, tuy nhiên cần đánh giá độc tính của chế phẩm như độc tính cấp và độc tính bán trường diễn (trên các cơ quan như gan, thận) để có thể kết luận đầy đủ hơn.

Kết quả này rất có ý nghĩa, tạo tiền đề khoa học quan trọng cho việc tiếp tục những nghiên cứu sâu hơn về tác dụng dược lí của Hải kim sa. Đồng thời, cần thiết có những nghiên cứu phân lập các hợp chất có hoạt tính ức chế có trong chiết xuất và tiềm năng nghiên cứu *in vitro*. Kết quả ức chế enzyme ACE và lipase tuy cũng là tiền khoa học quan trọng, mở ra những định hướng nghiên cứu về ứng dụng dược liệu Hải kim sa trong điều trị tăng huyết áp và béo phì.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu định tính thành phần sơ bộ hóa thực vật, khảo sát khả năng ức chế men chuyển ACE và lipase *in vitro* của lá Hải kim sa (*Ligodium japonicum*), kết quả cho thấy:

- Lá Hải kim sa có chứa các nhóm hợp chất: alkaloid, flavonoid, coumarin, saponin, antranoid, triterpenoid, tanin, acid hữu cơ, phenol, đường khử, polisaccharid, carotenoid.

- Cao chiết của lá Hải kim sa có hoạt tính ức chế tốt ACE và lipase tụy *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- R.M Carey, D.A Calhoun, G.L Bakris, R.D Brook, S.L Daugherty, C.R Dennison-Himmelfarb, W.B White, et al (2018), "Resistant hypertension: detection, evaluation, and management: a scientific statement from the American Heart Association", *Hypertension*, vol. 72, no. 5, pp. e53-e90.
- S Cai, O Wang, M Wang, J He, Y Wang, D Zhang, B Ji, et al (2012), "In vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids", *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, no. 29, pp. 7245-725.
- X Li, A Zhou, Y Han (2006), "Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polisaccharide from *Ligodium japonicum* in vitro", *Carbohydrate Polimers*, vol. 66, no. 1, pp. 34-42.
- W Ye, C Fan, L Zhang, Z Yin, S Zhao (2007), "A new phenolic glycoside from the roots of *Ligodium japonicum*", *Fitoterapia*, vol. 78, no. 7-8, pp. 600-601.
- Y Chen, Q Yang, Y Zhang (2020), "Licopodium japonicum: a comprehensive review on its phytochemicals and biological activities", *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 5, pp. 5438-5450.
- Bộ Y tế (2022), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- I Ciulei (1982), "Practical manual on the industrial utilisation of medicinal and aromatic plants 1. Methodology for analysis of vegetable drugs. Bucharest", *Romania*, pp. 1-62.
- Y.J Hwang, E.J Lee, H.R Kim, K.A Hwang (2013), "In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. lilacina", *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 13, pp. 1-9.
- D.H Ngo, B Ryu, S.K Kim (2014), "Active peptides from skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin - I converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation", *Food Chemistry*, vol. 143, pp. 246-255.
- J.H Kim, M.J Jang, Y.J Park (2023), "In vitro α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase, xanthine oxidase inhibiting activity of *Agaricus bisporus* extracts", *Mycobiology*, vol. 51, no. 1, pp. 60-66.
- Y Esha, M Munesh (2011), "Pharmacognostic and phytochemical investigation on the leaves of *Ligodium flexuosum* Linn", *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, vol. 2, no. 5, pp. 1588-1592.
- M.F Morais-Braga, T.M Souza, K.K Santos, J.C Andrade, G.M Guedes, S.R Tintino, H.D Coutinho, et al (2012), "Antimicrobial and modulatory activity of ethanol extract of the leaves from *Ligodium venustum* SW", *American Fern Journal*, vol. 102, no. 2, pp. 154-160.
- F Razafin-Drabazo, D Donno, N Tombozara, Z.R Razafindrakoto, J.F Rajaonarison, C Andrianjara, G.L Beccaro, et al (2020), "Phyto-compounds and pharmacological activities of *Ligodium lanceolatum* Desv.(Schizaeaceae)", *South African Journal of Botany*, vol. 135, pp. 225-232.
- P Goyal, R Mitra (2021), "A Brief Review on Plants Having Ace Inhibitory Activity", *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, pp. 3557-3567.
- D Iswantini, N Hanif, D Rizki Pranoto (2021), "Active Fraction as Anti-obesity by in Vitro toward Pancreatic Lipase Activity", *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 1070, no. 1, p. 012012.
- R.R Franco, V.H.M Alves, L.F.R Zabisky, A.B Justino, M.M Martins, A.L Saraiva, F.S Espindola, et al (2020), "Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitor and molecules with antioxidant and antiglication properties", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 123, p. 109798. □