



Original Article

## Evaluating the Acetylcholinesterase Inhibitory and Antioxidant Activities of *Persea Americana* Extracts

Dang Kim Thu\*, Hoang Thi Thuy, Bui Thi Thanh Duyen,  
Luc Thi Thanh Hang, Nguyen Thi Trang, Bui Son Nhat,  
Tran Thi Quynh Hoa, Duong Thi Ky Duyen, Bui Thanh Tung

*VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Received 13 May 2019

Revised 16 May 2019; Accepted 21 June 2019

**Abstract:** Medicinal plants are a potential source of enzyme acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, a key target in the treatment of Alzheimer's disease. This paper studies the AChE inhibitory activity and the antioxidant effect of *Persea Americana* Mill extract. The sample leaf, seed, exocarp and mesocarp of avocado were extracted with 50% ethanol and subsequently fractionated with n-hexane, ethyl acetate (EtOA) and n-butanol (n-BuOH) solvents. The AChE inhibitory activity was evaluated by Ellman's colorimetric method and the antioxidant activity by screening DPPH free radicals. The results show that the seed of *Persea Americana* extract had the strongest AChE inhibitory activity and antioxidant effect, followed by the leaf extract, and the exocarp extract and mesocarp extract were the weakest. The *Persea Americana* seed extract inhibited AChE activity in a dose-dependent manner with an  $IC_{50}$  value of  $47.43 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$  and the antioxidant effect with an  $IC_{50}$  value of  $68.7 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ . The results also show that n-BuOH fraction of *Persea Americana* seed extract had strong AChE inhibitory and antioxidant activities with an  $IC_{50}$  value of  $15.24 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$  and  $15.73 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The study results suggest that the *Persea Americana* Mill is a promising ingredient in Alzheimer's disease prevention and treatment.

**Keywords:** *Persea Americana* Mill, Acetylcholinesterase inhibitors (AChE), Alzheimer, DPPH.

\*Corresponding author.

Email address: [dangkimthu048@gmail.com](mailto:dangkimthu048@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4169>



## Nghiên cứu tác dụng ức chế Enzym Acetylcholinesterase và quét gốc tự do DPPH của cây Bơ (*Persea Americana* Mill.)

Đặng Kim Thu\*, Hoàng Thị Thúy, Bùi Thị Thanh Duyên,  
Lục Thị Thanh Hằng, Nguyễn Thị Trang, Bùi Sơn Nhật,  
Trần Thị Quỳnh Hoa, Dương Thị Kỳ Duyên, Bùi Thanh Tùng

*Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 13 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 16 tháng 5 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 21 tháng 6 năm 2019

**Tóm tắt:** Dược liệu là một nguồn tiềm năng chứa các chất có khả năng ức chế enzym Acetylcholinesterase (AChE) –enzym đích quan trọng trong điều trị bệnh Alzheimer. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng ức chế AChE và tác dụng chống oxy hóa của cây Bơ (*Persea Americana* Mill) gồm lá, quả, hạt và vỏ quả. Các mẫu được chiết siêu âm bằng ethanol 50% và tiến hành phân đoạn lần lượt với n-hexane, ethyl acetate (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH). Tác dụng ức chế AChE được tiến hành theo phương pháp đo quang của Ellman và tác dụng chống oxy hóa thông qua khả năng quét gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy cao chiết hạt quả Bơ có tác dụng ức chế AChE và DPPH mạnh nhất, tiếp theo là cao chiết lá, vỏ quả và thấp nhất là cao chiết thịt quả Bơ. Tác dụng ức chế AChE của cao chiết hạt Bơ theo cơ chế phụ thuộc nồng độ, có giá trị  $IC_{50}$  là  $47,43 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$  và tác dụng chống oxy hóa với  $IC_{50}$  là  $68,7 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ . Đánh giá các phân đoạn dịch chiết hạt Bơ cho thấy phân đoạn n-BuOH có hoạt tính ức chế AChE và DPPH mạnh nhất với  $IC_{50}$  lần lượt là  $15,24 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$  và  $15,73 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ , tiếp theo là phân đoạn n-hexan, EtOH và EtOAc. Kết quả nghiên cứu cho thấy hạt quả Bơ có tiềm năng trong việc phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer.

**Từ khóa:** Bơ; quả Bơ; lá Bơ; *Persea Americana* Mill; Enzym Acetylcholinesterase; Bệnh Alzheimer; DPPH.

### 1. Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer là một bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển liên quan đến tuổi, làm suy yếu khả năng nhớ và nhận thức mà nguyên nhân

chính được cho là do có sự tích tụ các mảng xơ amyloid beta –  $A\beta$  và các đám xơ rối *tau* protein [1]. Một trong những thay đổi sinh hóa đáng chú ý nhất ở bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer là sự

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: [dangkimthu048@gmail.com](mailto:dangkimthu048@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4169>

suy giảm nồng độ Acetylcholin trong vùng dưới đồi và vỏ não. Acetylcholinesterase (AChE) là một enzym có tác dụng thủy phân chất dẫn truyền thần kinh tại các synap thần kinh cholinergic bởi vậy các chất ức chế enzym AChE đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh Alzheimer. Bên cạnh đó, sự gia tăng quá mức các gốc tự do trong cơ thể gây ra hiện tượng “stress oxy hóa” được cho là nguyên nhân gây ra các bệnh mạn tính và thoái hóa như bệnh Parkinson và Alzheimer. **Tuy nhiên các chất ức chế enzym AChE như physostigmine, galantamine, tacrine, donepezil, metrifonate,... lại không mang lại hiệu quả cao và gây ra nhiều tác dụng không mong muốn** như: buồn nôn, nôn, đau bụng tiêu chảy, khó tiêu, phát ban.... [2]. Physostigmin là chất ức chế AChE đầu tiên được dùng cho nghiên cứu điều trị bệnh Alzheimer, nhưng đã bị thu hồi khỏi thị trường do một số tác dụng không mong muốn. Tacrine cũng gây độc đối với gan trong các thử nghiệm lâm sàng [3]. Ngoài ra, các thuốc thuộc nhóm chống oxy hóa như vitamin E, *Ginkgo biloba*... được sử dụng để điều trị những tổn thương liên quan đến nhận thức ở bệnh nhân Alzheimer có nguồn gốc từ tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu các dược liệu vừa có hoạt tính chống oxy hóa vừa có khả năng ức chế enzyme AChE để phòng và điều trị bệnh Alzheimer là hướng nghiên cứu thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới.

Bơ có tên khoa học là *Persea americana* Mill (Lauraceae), là một loại cây cận nhiệt đới có nguồn gốc từ Mexico và Trung Mỹ. Nghiên cứu cho thấy trong quả Bơ có chứa các hợp chất peptone, b-galactoside, axit glycosylated abscisic, alkaloids, cellulose, polygalacto urease, polyuronoids, cytochrome,... quả Bơ cũng đã được sử dụng cho điều trị một số bệnh như lở loét, tăng huyết áp, đau bụng, viêm phế quản, tiêu chảy và tiểu đường [4, 5]. Lá Bơ có tác dụng hạ glucose huyết và hạ cholesterol toàn phần và LDL, có tác dụng phòng ngừa xơ vữa động mạch [6]. Đặc biệt, lá Bơ còn có tác dụng trên hệ thần kinh như chống co giật, ức chế enzym AChE và butyrylcholinesterase và tác dụng chống oxy hóa. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng ức chế AChE và chống

oxy hóa DPPH của lá và quả Bơ nhằm phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer thông qua khả năng ức chế enzym AChE và tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết lá và các phần của quả Bơ.

## 2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Quả và lá Bơ được thu mua vào tháng 10 năm 2018 ở Đắk Lắk. Mẫu nghiên cứu được giám định thực vật học bởi Bộ môn Dược liệu – Dược cổ truyền, Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội. Quả rửa sạch và được bóc tách thành các phần: vỏ, thịt, hạt sau đó đem thái nhỏ, sấy khô ở 50°C. Lá rửa sạch, phơi và sấy khô ở 50°C sau đó vỏ nhỏ. Để nghiên cứu tác dụng dược lý tiến hành chiết xuất các phần trong quả Bơ (vỏ 65g, hạt 100g, thịt 100g) và lá Bơ (65g) khô bằng ethanol (EtOH) 50% được dịch chiết, lặp lại 3 lần và gộp dịch chiết sau đó lọc. Cô quay thu hồi cặn tạo thành cao tổng để tiến hành thử hoạt tính. Hiệu suất chiết từng phần thu được như sau: Lá 9,03%; Vỏ 17,51%; Hạt 25,8%; Thịt 43,65%. Phân tích, đánh giá kết quả thu được của cao tổng các loại: lá, vỏ, thịt, hạt quả để đưa ra phần có hoạt tính cao nhất, tiến hành chiết phân đoạn. Cao tổng của phần có hoạt tính cao nhất được tiến hành chiết phân đoạn như sau: Hòa tan cao trong EtOH 50° được dịch chiết, sau đó chiết lần lượt bằng các dung môi n-Hexan, EtOAc và n-Butanol thu được các phân đoạn dịch chiết. Cô quay thu hồi cặn dịch chiết các phân đoạn để tiến hành thử hoạt tính.

### 2.2. Phương pháp đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Hợp chất 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra gốc tự do bền trong dung dịch MeOH bão hòa, dung dịch có màu tím đỏ phản ứng với các chất chống oxy hóa để tạo ra phức hợp màu vàng không hấp thụ ánh sáng từ ngoại tại bước sóng 517 nm. Khi cho chất vào

dung dịch này nếu chất có khả năng quét các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp thụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Mẫu thử được pha thành các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp phản ứng gồm: 1100  $\mu$ l dung dịch DPPH (nồng độ 0,08 mg/ml) trong methanol, 100  $\mu$ l dịch thử các mẫu và 1800  $\mu$ l methanol được ủ ở 25°C trong 15 phút. Song song với mỗi mẫu thử, ta tiến hành đo mẫu chứng với cùng điều kiện và thành phần gồm: 1900  $\mu$ l methanol và 1100  $\mu$ l dung dịch DPPH (nồng độ 0,08 mg/ml trong methanol). Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hoạt tính quét gốc tự do DPPH được đánh giá thông qua giá trị phần trăm ức chế I (%) và được tính theo công thức:

$$I\% = \frac{A_c - A_t}{A_c - A_o} \times 100$$

Trong đó: I %: Hoạt tính chống oxy hóa

A<sub>c</sub>: Độ hấp thụ của mẫu chứng

A<sub>t</sub>: Độ hấp thụ của mẫu thử

A<sub>o</sub>: Độ hấp thụ của mẫu trắng (sử dụng methanol)

Tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết được so sánh với chất chuẩn dương là acid ascorbic. Giá trị chống oxy hóa IC<sub>50</sub> của mẫu được tính theo đồ thị nồng độ và % ức chế (I%).

### 2.3. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase

Cơ chất acetylthiocholin iodid (ACTI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Dựa vào xác định độ hấp thụ của mẫu thử ở 412 nm để đánh giá hoạt tính của AChE. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 700  $\mu$ l dung dịch đệm natri phosphat (pH 8,0); 100  $\mu$ l dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau và 100  $\mu$ l dung dịch enzym AChE 0,5 IU/ml. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Các dịch chiết được thử và chất chuẩn dương (Donepezil) được hòa tan trong 10% dimethyl sulfoxid (DMSO). Sau đó, thêm 50  $\mu$ l of DTNB 2,5 mM và 50  $\mu$ l ACTI 2,5 mM và trộn đều. Tiếp

tục ủ hỗn hợp trong 10 phút ở 25°C. Sau đó, dung dịch được đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Donepezil được sử dụng làm chứng dương.

Phần trăm ức chế hoạt độ enzym AChE (% I) được tính theo công thức:

$$\%I = \frac{A_c - A_t}{A_c - A_o} \times 100$$

Trong đó:

%I: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế

A<sub>c</sub>: độ hấp thụ của mẫu chứng (không chứa 100  $\mu$ l dung dịch thử)

A<sub>t</sub>: độ hấp thụ của mẫu thử

A<sub>o</sub>: độ hấp thụ của mẫu trắng (1 ml dung dịch đệm sodium phosphat)

### 2.4. Phương pháp đánh giá đặc điểm dược động học ức chế enzym AChE

Hỗn hợp phản ứng gồm 700  $\mu$ l dung dịch đệm sodium phosphat 0,1M (pH 8.0); 100  $\mu$ l dung dịch thử ở các nồng độ 0  $\mu$ g/ml, 7,5  $\mu$ g/ml; 15  $\mu$ g/ml và 30  $\mu$ g/ml và 100  $\mu$ l dung dịch enzym AChE 0,5 IU/ml. Trộn đều và đem ủ 15 phút tại 25°C. Sau đó, thêm 50  $\mu$ l dung dịch DTNB 2,5 mM và 50  $\mu$ l với các nồng độ khác nhau của cơ chất ACTI (1,25; 2,5; 5 mM) và trộn đều. Tiến hành đo độ hấp thụ quang của dung dịch thu được ở bước sóng 412 nm trong vòng 5 phút. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sử dụng các đồ thị 1/[ACTI] và 1/V (1/tốc độ phản ứng) (đồ thị Lineweaver – Burk) để xác định kiểu động học ức chế enzym. Hằng số K<sub>i</sub> được xác định là điểm giao của các đường nồng độ phân đoạn dịch chiết IC<sub>50</sub> nhỏ nhất với 1/V (1/tốc độ phản ứng) (đồ thị Dixon – Dixon plot) trên trục Ox

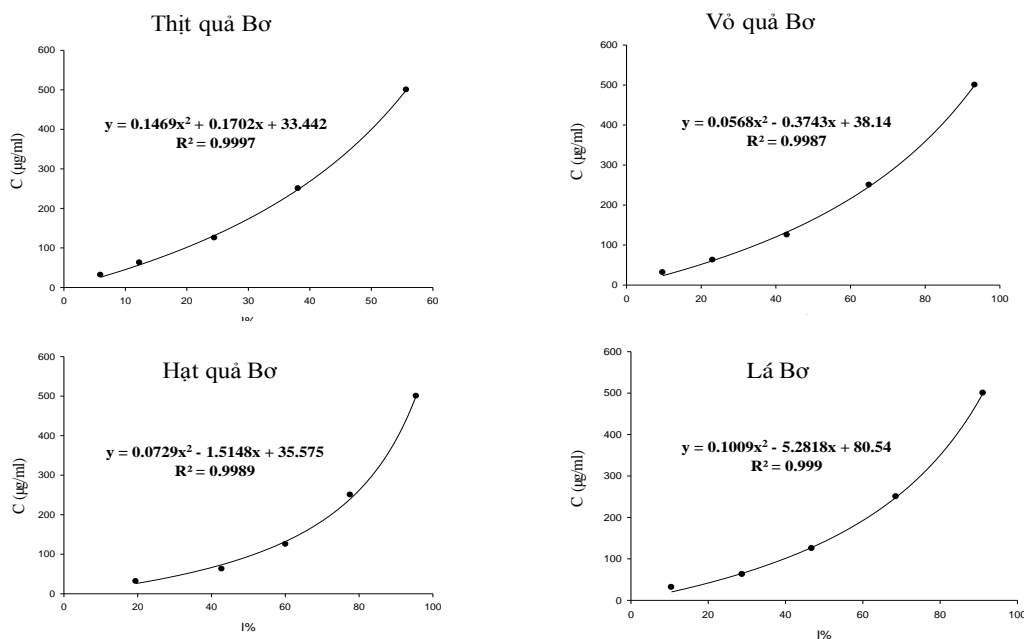
### 2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phần mềm SigmaPlot 12, Microsoft excel 2013. Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$  ( $\bar{X}$ : giá trị trung bình của mẫu thử, SD: độ lệch chuẩn).

### 3. Kết quả

#### 3.1. Kết quả đánh giá hoạt tính cao chiết các thành phần lá, vỏ, thịt và hạt quả Bơ

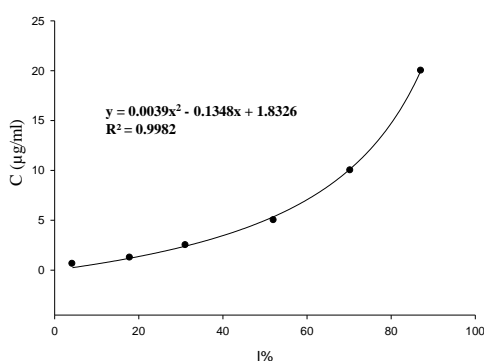
##### 3.1.1. Tác dụng chống oxy hóa *in vitro*



Hình 1. Đồ thị biểu diễn khả năng quét gốc tự do DPPH của lá Bơ và các phần quả Bơ.

Bảng 1. Giá trị  $IC_{50}$  của lá Bơ, các phần trong quả Bơ và acid ascorbic về khả năng quét gốc tự do DPPH

Mẫu thử	Lá Bơ	Vỏ quả Bơ	Thịt quả Bơ	Hạt quả Bơ	Acid ascorbic
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$142,09 \pm 1,00$	$161,43 \pm 0,88$	$409,20 \pm 0,53$	$68,70 \pm 0,35$	$4,84 \pm 0,35$



Hình 2. Đồ thị biểu diễn khả năng quét gốc tự do DPPH của acid ascorbic.

Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên mô hình quét gốc tự do DPPH của các mẫu thử dịch chiết toàn phần ở nồng độ khác nhau của lá, vỏ quả, thịt quả và hạt quả Bơ được trình bày ở hình 1. Song song với các mẫu thử, tiến hành tương tự với mẫu chứng kết quả thu được trình bày ở hình 2.

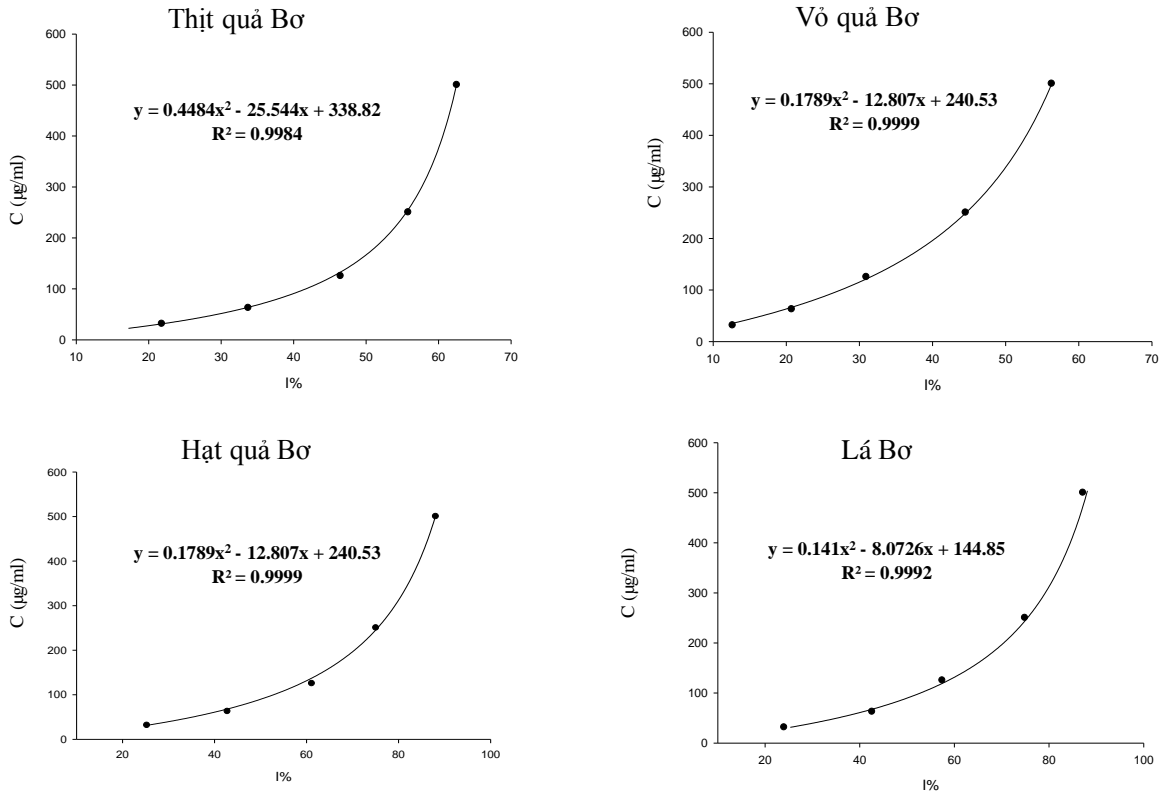
Từ hình 1 và hình 2 ta tính được giá trị  $IC_{50}$  (nồng độ ức chế 50%) của các mẫu thử được trình bày trong bảng 1.

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy tác dụng quét gốc tự do DPPH *in vitro* của các bộ phận khác nhau đều tăng dần theo nồng độ. Trong các mẫu thử, cao chiết hạt quả Bơ thể hiện tác dụng quét gốc tự do DPPH tốt nhất với  $IC_{50}$  là  $68,70 \pm 0,35$   $\mu\text{g/ml}$ , sau đó là lá Bơ và vỏ quả Bơ với  $IC_{50}$  lần lượt là  $142,09 \pm 1,00$   $\mu\text{g/ml}$  và  $161,43 \pm 0,88$   $\mu\text{g/ml}$ . Thịt quả Bơ gần như không thể hiện tác dụng chống oxy hóa với giá trị  $IC_{50}$  thu được là  $409,20 \pm 0,53$   $\mu\text{g/ml}$ , gấp gần 100 lần mẫu chứng. Song song với mẫu thử tiến hành tương

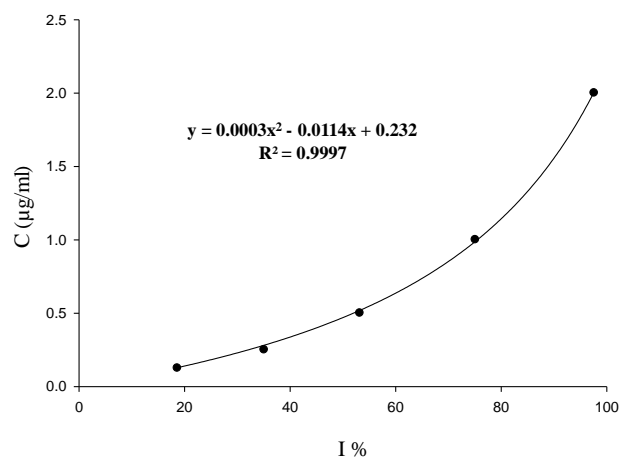
tự với mẫu chứng là acid ascorbic thu được giá trị  $IC_{50}$  là  $4,84 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ .

### 3.1.2. Tác dụng ức chế enzym AChE

Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của dịch chiết toàn phần lá, các bộ phận của quả Bơ và chất đối chứng Donezepil được thể hiện ở hình 3 và hình 4.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế AChE *in vitro* của lá Bơ và các phần quả Bơ.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế AChE *in vitro* của Donezepil.

Bảng 2. Giá trị IC<sub>50</sub> khả năng chống oxy hóa và ức chế enzym AChE của các phần quả Bơ, lá Bơ và chất chuẩn

Mẫu thử	Donepezil	Hạt quả	Lá	Vỏ quả	Thịt quả
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	0,41 ± 0,12	47,43 ± 0,5	93,72 ± 1,86	376,29 ± 0,68	182,62 ± 2,5

Dựa vào đồ thị nồng độ và phần trăm ức chế, ta xác định giá trị IC<sub>50</sub> của các mẫu, chất chuẩn donepezil cho khả năng ức chế AChE. Kết quả thu được ở bảng 2.

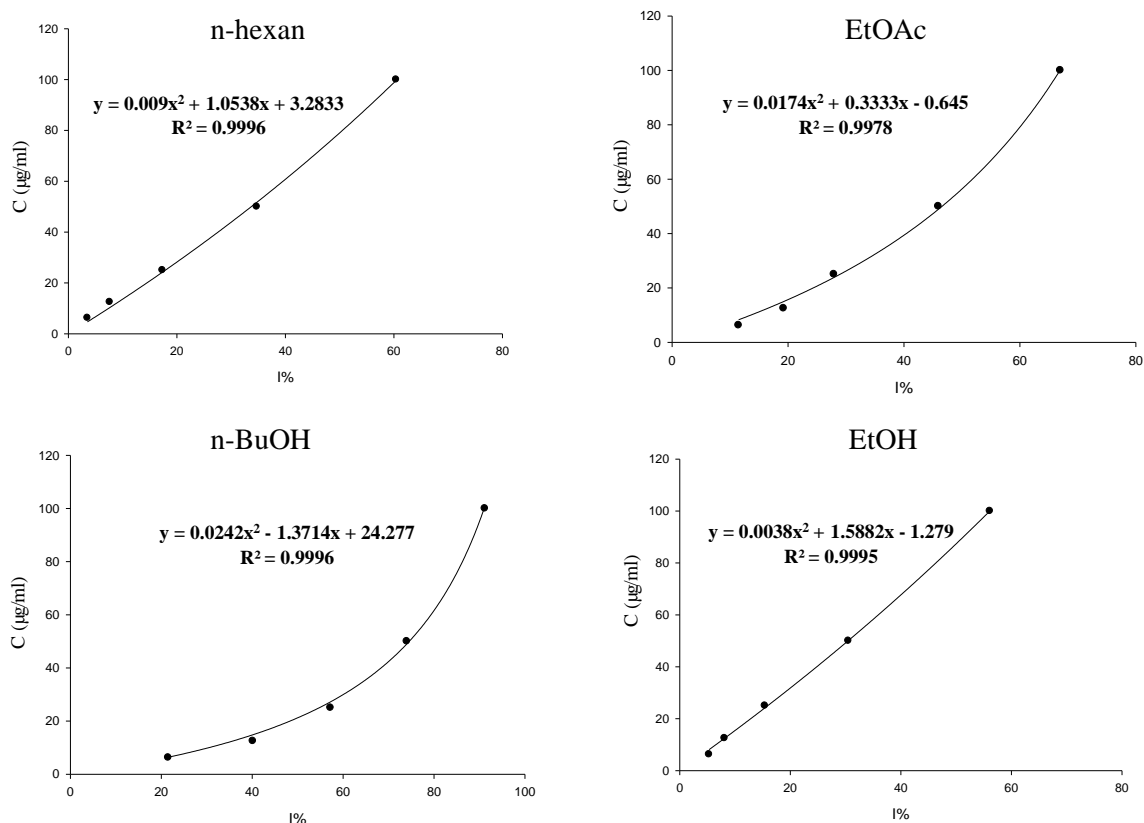
Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết hạt quả Bơ cho tác dụng ức chế enzym AChE tốt nhất với giá trị IC<sub>50</sub> là 47,43 ± 0,50 µg/ml, tiếp theo là cao chiết lá Bơ với IC<sub>50</sub> là 93,72 ± 1,86 µg/ml. Cao chiết thịt quả Bơ và vỏ quả Bơ gần như không cho tác dụng ức chế enzym AChE với IC<sub>50</sub> lần lượt là 182,62 ± 2,50 µg/ml và 376,29 ± 0,68 µg/ml. Song song với các mẫu thử, tiến hành tương tự với mẫu chứng là donepezil thu được giá trị IC<sub>50</sub> là 0,41 ± 0,12 µg/ml.

Từ bảng số liệu cho thấy hạt quả Bơ có tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym AChE tốt nhất nên ta tiến hành đánh giá hoạt tính sinh học của các phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ.

### 3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính các phân đoạn trong hạt Bơ

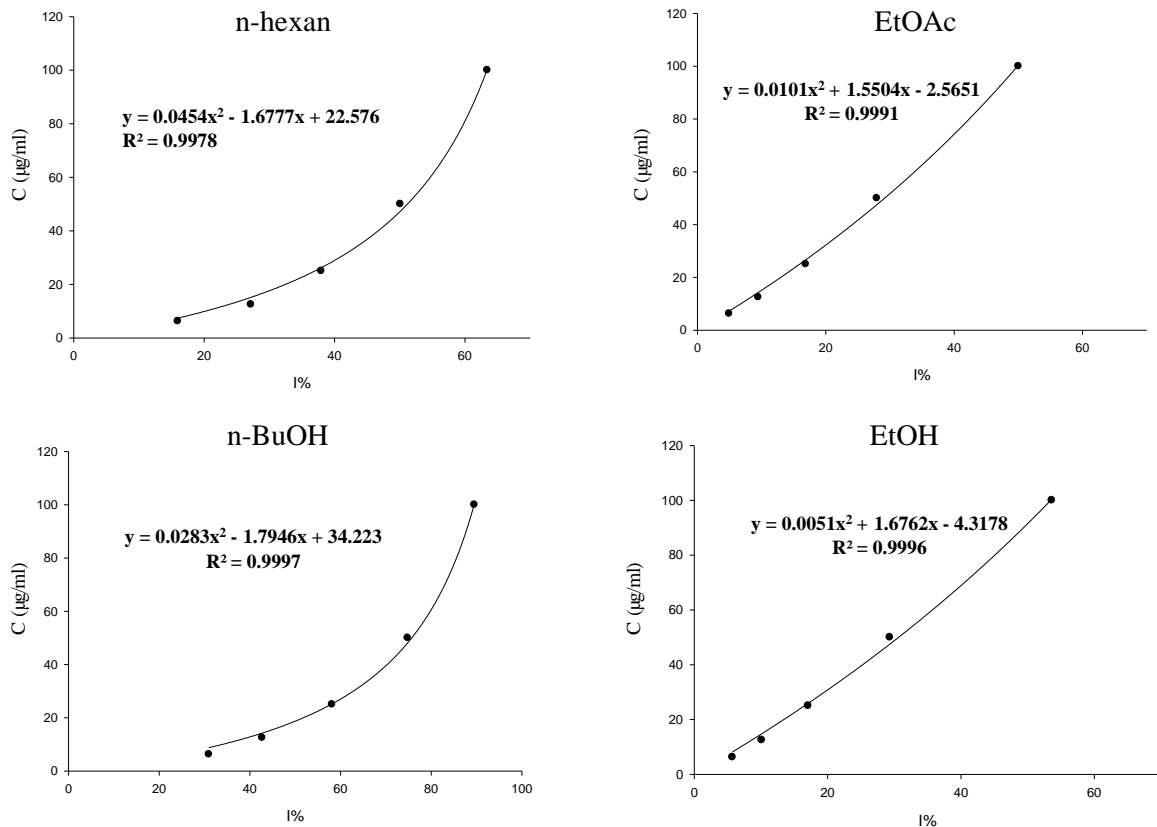
#### 3.2.1. Tác dụng chống oxy hóa

Khả năng quét các gốc tự do DPPH của các phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ được thể hiện trong đồ thị giữa phần trăm chống oxy hóa (%) và nồng độ mẫu thử (hình 5).



Hình 5. Đồ thị biểu diễn khả năng quét gốc tự do DPPH của phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ.

Kết quả thu được tại phân đoạn n-BuOH khả năng quét gốc tự do DPPH là tốt nhất với giá trị  $IC_{50}$  thu được là  $15,73 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ , sau đó là phân đoạn EtOAc và phân đoạn n-hexan với giá trị  $IC_{50}$  tính được lần lượt là  $59,51 \pm 1,61 \mu\text{g/ml}$ ;  $78,47 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$  và kém nhất là phân đoạn EtOH với  $IC_{50}$  là  $87,63 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ .



Hình 6. Đồ thị biểu diễn khả năng ức chế AChE *in vitro* phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy các phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ đều có tác dụng ức chế AChE ở các dải nồng độ thử. Trong đó phân đoạn n-BuOH cho tác dụng ức chế tốt nhất với giá trị  $IC_{50}$  là  $15,24 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$ ; sau đó là phân đoạn n-hexan và EtOH với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $52,19 \pm 1,1 \mu\text{g/ml}$  và  $92,24 \pm 0,88 \mu\text{g/ml}$  và phân đoạn EtOAc có tác dụng thấp nhất với  $IC_{50}$  là  $99,94 \pm 3,23 \mu\text{g/ml}$ .

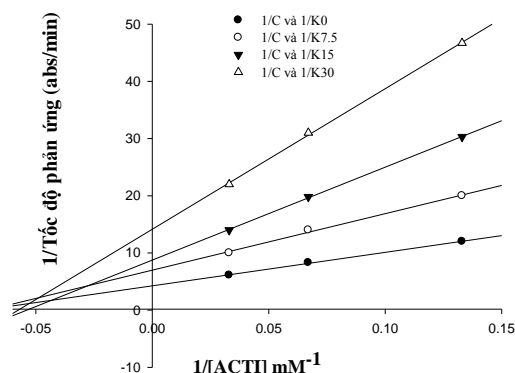
### 3.2.2. Tác dụng ức chế enzyme AChE

Kết quả khả năng ức chế enzyme AChE của các phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ được thể hiện trong hình 6.

### 3.3. Kết quả xác định động học ức chế enzyme AChE

Động học ức chế enzyme AChE được mô tả bằng đồ thị Lineweaver-Burk, được xây dựng từ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa giá trị độ hấp thụ quang với thời gian phản ứng của cơ chất ACTI ở các nồng độ khác nhau. Tác dụng ức chế enzyme AChE của các phân đoạn dịch chiết n-BuOH của hạt quả Bơ thể hiện trong hình 7 (Đồ thị Lineweaver-Burk plot).

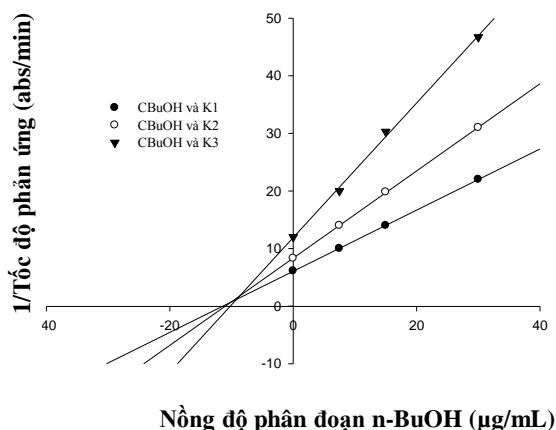




Hình 7. Đồ thị Lineweaver – Burk cho phân đoạn dịch chiết n-BuOH hạt quả Bơ.

Từ đồ thị Lineweaver-Burk ta xác định được kiểu ức chế enzyme AChE của phân đoạn dịch chiết n-BuOH là ức chế hỗn hợp. Tiếp tục tiến hành xây dựng đồ thị động học Dixon của phân đoạn dịch chiết n-BuOH dựa trên đồ thị biểu diễn

mối tương quan giữa giá trị độ hấp thụ quang với thời gian phản ứng của phân đoạn dịch chiết n-BuOH ở các nồng độ 0; 7,5; 15; 30  $\mu\text{g/mL}$ , kết quả được thể hiện ở hình 8.



Hình 8. Đồ thị Dixon của phân đoạn dịch chiết n-BuOH hạt quả Bơ.

Từ đồ thị Dixon ta xác định được hằng số ức chế  $K_i$  được xác định là điểm giao của các đường [nồng độ phân đoạn dịch chiết n-BuOH] và  $1/V$  ( $1/\text{tốc độ phản ứng}$ ) trên trục Ox, giá trị  $K_i$  thu được là  $9,07 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ .

#### 4. Bàn luận

Theo các nghiên cứu về bệnh học Alzheimer thì quá trình oxy hóa kéo dài là một đặc điểm

điển hình của bệnh với đặc điểm là lượng peroxid hóa lipid, oxy hóa protein và oxy hóa ADN đều tăng cao trong não [7]. Các nghiên cứu đã chỉ ra nguyên nhân của quá trình oxy hóa này chủ yếu là do protein beta – amyloid gây ra trên tế bào thần kinh nên phương hướng tiếp cận điều trị sẽ là sử dụng các liệu pháp chống oxy hóa. Phương pháp DPPH là một trong các phương pháp được sử dụng rộng rãi trong các mô hình nghiên cứu đánh giá khả năng chống oxy hóa của các chất trong quá trình nghiên cứu và phát triển

thuốc mới [8]. Vì thế trong nghiên cứu này chúng tôi cũng sử dụng phương pháp DPPH để đánh giá tác dụng chống oxy hóa của các mẫu thử. Chất đối chứng chúng tôi sử dụng là acid ascorbic thu được giá trị  $IC_{50}$  của acid ascorbic là  $4,84 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$  tương đồng với các nghiên cứu trước đây [9; 10] cho thấy phương pháp thử nghiệm phù hợp và kết quả thu được có ý nghĩa.

Bên cạnh liệu pháp chống oxy hóa thì một hướng điều trị nữa được tiến hành nghiên cứu trong điều trị bệnh Alzheimer là nghiên cứu các chất ức chế enzym AChE – xúc tác quá trình thủy phân chất dẫn truyền ACh mà theo nghiên cứu nồng độ chất dẫn truyền ACh giảm trầm trọng ở bệnh nhân Alzheimer gây suy giảm khả năng nhận thức của người bệnh [7; 11]. Với nhiều ưu điểm hơn các phương pháp khác, phương pháp đo quang Ellman được chúng tôi sử dụng để đánh giá tác dụng ức chế enzym AChE của các mẫu thử với một số thay đổi cho phù hợp với điều kiện nghiên cứu. Chúng tôi sử dụng chất đối chứng là Donepezil vì đây là một trong những thuốc được FDA chấp thuận sử dụng cho bệnh nhân bị Alzheimer thông qua cơ chế ức chế AChE [12]. Bên cạnh đó nó cũng được sử dụng phổ biến làm chất đối chứng trong các thử nghiệm đánh giá tác dụng ức chế enzym AChE [13; 14]. Kết quả thu được Donepezil thể hiện khả năng ức chế AChE rõ rệt với giá trị  $IC_{50}$  là  $0,41 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$  tương đồng với các nghiên cứu trước đây như của Fernandes và cộng sự hay Ahmad Mohammadi-Farani và cộng sự [13; 14]. Vì vậy phương pháp và chất đối chứng lựa chọn là phù hợp với thí nghiệm này.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cao chiết từ lá và các phân trong quả Bơ đều có tác dụng quét các gốc tự do DPPH và khi các nồng độ biến thiên thì khả năng quét các gốc tự do cũng biến thiên theo. Trong đó, cao chiết từ hạt quả Bơ cho tác dụng tốt nhất so với các bộ phận còn lại với  $IC_{50}$  là  $68,7 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ . Điều này chứng tỏ, trong cao chiết hạt quả Bơ chứa nhiều chất có khả năng quét các gốc tự do DPPH hơn các phần khác như phenol, sterol, flavonoid. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi tác giả Maha I Alkhalif đã tiến hành nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa chỉ ra hạt quả Bơ có tác dụng chống oxy hóa tốt hơn thịt

quả Bơ [15]. Hạt quả Bơ cũng được tác giả Gómez nghiên cứu để sử dụng làm chất chống oxy hóa trong thực phẩm [16]. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết hạt quả Bơ [17; 18].

Bằng phương pháp Ellman chúng tôi nghiên cứu thấy lá và các phân trong quả Bơ đều có tác dụng ức chế enzym AChE theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ chất thử, nghĩa là tác dụng ức chế tăng dần theo nồng độ thử. Cao chiết hạt quả Bơ cho thấy khả năng ức chế cao nhất với  $IC_{50}$  là  $47,43 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$  do trong hạt quả Bơ chứa hàm lượng cao các chất có khả năng ức chế enzym AChE như phenolic, saponin, alkanoid, terpenoid... Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây của Oboh và cộng sự đã kết luận dịch chiết hạt quả Bơ có tác dụng ức chế enzym AChE và chống oxy hóa [19].

Tiến hành nghiên cứu tiếp các phân đoạn của cao chiết hạt quả Bơ ta thu được kết quả là phân đoạn n-BuOH cho tác dụng ức chế AChE tốt nhất ( $IC_{50}$  tại  $15,24 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$ ) và chống oxy hóa tốt nhất ( $IC_{50} = 15,73 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ ). Phân đoạn n-BuOH của dịch chiết hạt quả Bơ có tác dụng ức chế enzym AChE và chống oxy hóa cao nhất trong các phân đoạn có thể giải thích là do BuOH là dung môi phân cực nên các hợp chất như phenol, flavonoid... tan chủ yếu trong dung môi này. Kết quả tác dụng ức chế enzym AChE và chống oxy hóa là do tác dụng hiệp đồng của các hợp chất trong phân đoạn dịch chiết này. Hướng nghiên cứu tiếp theo nên tập trung vào phân lập, xác định hợp chất và làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của các hợp chất.

Động học ức chế enzym AChE của dịch chiết hạt quả Bơ chưa từng được công bố trước đây nên trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành đánh giá động học ức chế enzym của phân đoạn có tác dụng mạnh nhất – phân đoạn n-BuOH. Đồ thị động học Lineweaver–Burk có tính chất trung gian giữa 2 kiểu ức chế cạnh tranh và không cạnh tranh, cho thấy kiểu ức chế của phân đoạn dịch chiết n-BuOH là kiểu ức chế hỗn hợp (trong đồ thị Lineweaver–Burk thì hệ số góc  $=K_m/V_{max}$ , điểm giao trục Ox  $= -1/K_m$ ). Đồ thị động học Dixon có tính chất đặc trưng của chất ức chế cạnh tranh. Hằng số ức chế  $K_i$  được xác định là giá trị tuyệt đối từ điểm giao của 3 đường

trên trục Ox trên đồ thị Dixon, được vẽ theo  $1/($ tốc độ phản ứng) theo nồng độ phân đoạn dịch chiết n-BuOH. Giá trị  $K_i$  được xác định theo đồ thị Dixon là  $9,07 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ .  $K_i$  là hằng số ức chế enzym cho phép đánh giá độ mạnh yếu của chất ức chế, còn gọi là hằng số phân ly của phức hợp enzym – chất ức chế. Nếu hằng số  $K_i$  nhỏ, chất ức chế bị liên kết chặt với enzym nên lượng enzym hoạt động sẽ nhỏ, do vậy tác dụng ức chế mạnh. Phân đoạn n-BuOH của dịch chiết hạt quả Bơ có giá trị hằng số  $K_i$  nhỏ chứng tỏ có tác dụng ức chế enzym AChE mạnh. Kiểu ức chế hỗn hợp là kiểu ức chế đặc trưng của dược liệu, nguyên nhân là do trong thành phần dịch chiết có chứa một loạt các hợp chất có nhiều cơ chế tác dụng khác nhau. Cơ chế ức chế cho thấy các hợp chất có hoạt tính trong phân đoạn dịch chiết n-BuOH có thể cạnh tranh với ACTI để gắn vào trung tâm hoạt động – vị trí liên kết với cơ chất của enzym AChE hoặc kết hợp với enzym AChE hoặc kết hợp với phức hợp AChE-ACTI [20].

## 5. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được tác dụng chống oxy hóa và ức chế enzym AChE của dịch chiết lá và các thành phần của quả Bơ: hạt, thịt bơ. Kết quả cho thấy hạt quả Bơ có tác dụng chống oxy hóa tốt nhất với giá trị  $IC_{50}$  là  $68,7 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$  và tác dụng ức chế enzym AChE mạnh với giá trị  $IC_{50}$  là  $47,43 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Trong các phân đoạn dịch chiết hạt quả Bơ thì phân đoạn n-BuOH có tác dụng chống oxy hóa ( $IC_{50} = 15,73 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$ ) và ức chế enzym AChE ( $IC_{50} = 15,24 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$ ) cao nhất. Đặc điểm động học ức chế enzym AChE của phân đoạn dịch chiết n-BuOH của hạt quả Bơ là kiểu ức chế hỗn hợp với hằng số  $K_i$  là  $9,07 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ . Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết hạt quả Bơ, đặc biệt là phân đoạn n-BuOH có tiềm năng hỗ trợ phòng và điều trị các bệnh liên quan đến Alzheimer và các rối loạn thần kinh

## Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Khoa Y Dược, Đại Học Quốc Gia Hà Nội, mã số đề tài CS.18.01.

## Tài liệu tham khảo

- [1] M.M. Essa et al., Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease, *Neurochem Res.* 37(9) (2012) 1829.
- [2] B. McGleenon, K. Dynan, A. Passmore., Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *British journal of clinical pharmacology.* 48 (1999) 471.
- [3] P. B. Watkins et al, Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease, In: *Jama.* pp. 992 (1994).
- [4] O. Adeyemi, S. Okpo, O. Ogunti., Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). In: *Fitoterapia.* pp. 375 (2002).
- [5] P.D.D. Dzeufiet, et al, Antihypertensive potential of the aqueous extract which combine leaf of *Persea americana* Mill. (Lauraceae), stems and leaf of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.(Poaceae), fruits of *Citrus medica* L.(Rutaceae) as well as honey in ethanol and sucrose experimental model. In: *BMC complementary and alternative medicine.* p. 507 (2014).
- [6] B.I. Brai, A. Odetola, P. Agomo., Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts, *Journal of medicinal food.* 10(2) (2007) 356.
- [7] Phạm Khuê. Bệnh Alzheimer. Nhà xuất bản Y học (2002).
- [8] Đàm Trung Bào. Các gốc tự do, *Tạp chí Dược học.* 6 (2001) 29.
- [9] F.R. Mowsumi, A. Rahaman, N.C. Sarker, B.K. Choudhury, S. Hossain, In vitro relative free radical scavenging effects of *Calocybe indica* (milky oyster) and *Pleurotus djamor* (pink oyster), *World J Pharm Pharm Sci.* 4(07) (2015) 186.
- [10] Y. Bao, Y. Qu, J. Li, Y. Li, X. Ren, K. Maffuci, et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of the flowers and leaves from *Paeonia rockii* and identification of their antioxidant constituents by UHPLC-ESI-HRMSn via pre-column DPPH reaction, *Molecules.* 23(2) (2018) 392.
- [11] Phan Kế Sơn. Đánh giá tác dụng ức chế enzym Acetylcholinesterase in vitro của các phân đoạn dịch chiết Hoàng Liên Ô rô (*Mahonia Nepalensis* DC., họ Berberidaceae). Khóa luận tốt nghiệp Đại học ngành Dược học. Khoa Y Dược - Đại học Quốc Gia Hà Nội (2017).
- [12] D. Mohammad, P. Chan, J. Bradley, K. Lanctôt, N. Herrmann, Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms-a safety evaluation, *Expert opinion on drug safety.* 16(9) (2017) 1009.

- [13] A. Mohammadi-Farani, S.S. Darbandi, A. Aliabadi, Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory evaluation of 4-(1, 3-dioxoisindolin-2-yl)-N-phenyl benzamide derivatives as potential anti-alzheimer agents, Iranian journal of pharmaceutical research. IJPR 15(3) (2016) 313.
- [14] T.B. Fernandes, M.R. Cunha, R.P. Sakata, T.M. Candido, A.R. Baby, M.T. Tavares, et al. Synthesis, Molecular Modeling, and Evaluation of Novel Sulfonylhydrazones as Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease, Archiv der Pharmazie. 350(11) (2017) 1700163.
- [15] M.I. Alkhalif, W.S. Alansari, E.A. Ibrahim, M.E. Elhalwagy, Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. Journal of King Saud University-Science (2018).
- [16] F. Gómez, S. Sánchez, M. Iradi, N. Azman, M. Almajano, Avocado seeds: extraction optimization and possible use as antioxidant in food, Antioxidants. 3(2) (2014) 439.
- [17] O.A. Folasade, R.A. Olaide, T.A. Olufemi, Antioxidant properties of *Persea americana* M. seed as affected by different extraction solvent, Journal of Advances in Food Science & Technology. 3(2) (2016) 101.
- [18] C.A. Alagbaoso, I.I. Tokunbo, O.S. Osakwe, Comparative study of antioxidant activity and mineral composition of methanol extract of seeds of ripe and unripe avocado pear (*Persea americana*, Mill.). NISEB Journal. 15(4) (2017).
- [19] G. Oboh, V.O. Odubanjo, F. Bello, A.O. Ademosun, S.I. Oyeleye, E.E. Nwanna et al. Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities in vitro, Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. 27(2) (2016) 131.
- [20] H. Cavdar, M. Senturk, M. Guney, S. Durdagi, G. Kayik, C.T. Supuran, et al. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies, Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 34(1) (2019) 429.