

SÀNG LỌC TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM TYROSINASE TRÊN *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ DƯỢC LIỆU VIỆT NAM

Nguyễn Thị Phương¹, *, Lê Thị Thu Hương², Nguyễn Thị Lý¹, Đặng Viết Hậu¹, Nguyễn Văn Hiệp¹,
Phạm Thị Nguyệt Hằng¹, Lê Thị Xoan¹

¹Viện Dược liệu; ²Trường Đại học Dược Hà Nội

*Email: phuongduocly@gmail.com

(Nhận bài ngày 08 tháng 5 năm 2024)

Tóm tắt

Tyrosinase là một enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp tạo nên sắc tố cho da và mắt cũng như vết thâm trên hoa quả. Nếu sắc tố da bị dư thừa, tích tụ làm đen da, tạo vết thâm và đồi mồi trên da thì ức chế enzym tyrosinase (Tyr) là một trong những hướng nghiên cứu để ngăn ngừa và điều trị. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc tác dụng ức chế tyrosinase trên *in vitro* của 70 mẫu cao chiết dược liệu ở nồng độ 200 µg/mL, trong đó đã xác định được giá trị IC₅₀ của 26 mẫu có tác dụng ức chế tốt hơn. Kết quả đã sàng lọc được 04 cao chiết có tác dụng tốt: cao chiết nho dại có tác dụng ức chế Tyr tốt nhất với IC₅₀ là 14,6 µg/mL; sau đó là các cao chiết dâu tằm, kim tiền thảo có giá trị IC₅₀ lần lượt là 17,1 và 19,8 µg/mL; tác dụng yếu hơn 3 mẫu trên là cao chiết cốt khí củ với IC₅₀ là 26,6 µg/mL. Cả 4 cao chiết đều thể hiện hoạt tính ức chế Tyr tốt hơn acid kojic (IC₅₀ = 49,7 µg/mL). Các cao chiết còn lại có tác dụng yếu với IC₅₀ xung quanh 200 µg/mL.

Từ khóa: Enzyme tyrosinase, nho dại, kim tiền thảo, dâu tằm, cốt khí củ.

Summary

Screening on the Tyrosinase Inhibitory Activity *in vitro* of some Vietnamese Herbs

Tyrosinase is an enzyme that plays a crucial role in the melanogenesis of human's skin and eye and the browning of food products. Thus, tyrosinase inhibitors are useful to the cosmetic and food industries. In this work, we screened ethanol extracts of 70 herbs on inhibition of tyrosinase activity at concentration of 200 µg/mL and identified IC₅₀ values of 26 herbs. The results showed that the extract of *Vitis vinifera* L. exhibited the highest anti-tyrosinase activity with the IC₅₀ value of 14.59 µg/mL, the *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr extract and *Morus alba* L. extract also have strong activity with the IC₅₀ values of 17.1 µg/mL and 19.8 µg/mL, respectively. *Reynoutria japonica* Houtt. extract possessed the anti-tyrosinase activity with IC₅₀ value of 26.6 µg/mL, its effect is also stronger than that of kojic acid with IC₅₀ value of 49.7 µg/mL. Other extracts showed much weaker effect on anti-tyrosinase activity.

Keywords: Enzyme tyrosinase, *Vitis vinifera* L., *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr, *Morus alba* L., *Reynoutria japonica* Houtt.

1. Đặt vấn đề

Tyrosinase là một monooxygenase enzym có ở trong vi khuẩn, nấm, thực vật bậc cao và các loài động vật. Tyrosinase tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin ở động vật có vú tạo nên sắc tố cho da, mắt và tóc. Melanin giúp bảo vệ da khỏi tác hại của tia tử ngoại (UV) từ ánh sáng mặt trời và loại bỏ các nhân tố gây oxy hoá. Tuy nhiên, nhiều rối loạn dẫn đến sự tích tụ dư thừa của sắc tố da, gây đen da, đồi mồi trên da và các vết thâm [1]. Ngoài ra, các báo cáo cho thấy rằng tyrosinase còn có thể có vai trò quan trọng trong quá trình gây độc thần kinh của dopamin cũng như góp phần gây thoái hoá thần kinh có liên quan đến bệnh Parkinson, ung thư da [2],[3],[4].

Ở thực vật, tyrosinase xúc tác tạo ra các hợp chất quinon làm rau quả bị thâm. Không chỉ ảnh hưởng tới màu sắc mùi vị của hoa quả mà các hợp chất quinon sinh ra do phản ứng gây thâm ở rau và hoa quả còn có thể làm giảm hoặc mất giá trị dinh dưỡng dẫn đến việc không sử dụng được gây lãng phí nguồn thực phẩm [5]. Tyrosinase cũng có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và tự bảo vệ ở côn trùng. Tyrosinase có liên quan đến quá trình melanogenesis, làm lành vết thương, chống lại vật ký sinh và hình thành vỏ cứng ở côn trùng.

Do vậy, việc phát triển các chất ức chế tyrosinase rất cần thiết trong lĩnh vực y học (có vai trò quan trọng trong các loại dược phẩm và mỹ phẩm bởi khả năng ngăn ngừa và điều trị các rối loạn sắc tố da [6]) cũng như trong nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. Việc phát triển các chất có khả năng ức chế hiệu quả tyrosinase đã trở thành một phương pháp mới kiểm soát các loại côn trùng gây hại để cải thiện chất lượng và giá trị dinh dưỡng của thực phẩm, kiểm soát côn trùng gây hại, ngăn ngừa các rối loạn sắc tố và các vấn đề sức khỏe khác liên quan đến melanin ở người. Đó là hướng nghiên cứu hấp dẫn trong cả y học và công nghiệp hoá mỹ phẩm [3],[4],[5],[7].

Qua các nghiên cứu đã được công bố cho thấy dược liệu có rất nhiều tiềm năng ức chế tyrosinase. Việt Nam là quốc gia có nguồn tài nguyên dược liệu phong phú với hơn 4000 loài cây thuốc trong đó có nhiều loài dược liệu quý được thế giới công nhận. Do đó tiềm năng sử dụng dược liệu trong các sản phẩm làm đẹp, mỹ phẩm ở Việt Nam là rất lớn và cần được khai thác. Nghiên cứu này được thực hiện trên cơ sở kế thừa nguồn cao chiết sẵn có từ đề tài trước cũng như dược liệu được trồng ở các Trung tâm cây thuốc Hà Nội, Tam Đảo, Thanh Hóa và Sa Pa.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Các dược liệu được đưa vào nghiên cứu sàng lọc:

Danh sách các dược liệu nghiên cứu sàng lọc được thống kê trong bảng 1. Các dược liệu được thu hái ở Việt Nam, tại nhiều địa điểm khác nhau.

2.1.2. Trang thiết bị và hóa chất nghiên cứu:

Trang thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Máy cất quay Buchi Rotavapor R220 (Thụy Sĩ), tủ sấy chân không (Heraeus instruments vacutherm - Đức), máy đọc Elisa Spectramax iD3 (Molecular Devices - Mỹ), máy lắc Minishaker (IKA- Italy), cân phân tích AU220 (Shimadzu - Nhật), bể siêu âm... và các trang thiết bị thông thường khác.

Các hóa chất sử dụng: Tyrosinase từ nấm (Sigma-Aldrich); L-Tyrosine (USP - Mỹ); Acid Kojic (AK Sciencetific - Mỹ); DMSO (Dimethyl sulfoxid; Fisher - Mỹ); Monopotassium phosphate (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich); Dipotassium phosphate (K_2HPO_4); cồn công nghiệp và các hóa chất thông thường khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết cao:

Mẫu dược liệu sau khi thu hái, loại bỏ tạp chất, được cắt nhỏ, sấy ở nhiệt độ 50°C đến khi đạt độ ẩm dưới 10%, nghiền nhỏ, qua rây 2 mm. Dược liệu sau đó được ngâm với cồn 80% (các mẫu từ STT 43 đến 70 trong Bảng 1) hoặc cồn 70% (các mẫu từ STT 1 đến 42 trong Bảng 1) trong 48 h ở nhiệt độ phòng, tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1/10. Lọc thu lấy dịch chiết lần 1. Phần bã dược liệu tiếp tục được ngâm chiết 2 lần nữa, mỗi lần trong thời gian 24 h. Gôm dịch chiết của 3 lần, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết. Cao chiết được sấy trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khi thu được cao khô.

2.2.2. Phương pháp sàng lọc khả năng ức chế tyrosinase *in vitro*:

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Ji Young Moon và cs. [8] có điều chỉnh cho phù hợp điều kiện. Nguyên tắc của phương pháp: Cơ chất L-Tyrosin bị thủy phân bởi enzym tyrosinase (Tyr) tạo thành L-Dopaquinon có màu vàng, có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490 nm. Các mẫu cao chiết được pha với dung môi DMSO đến nồng độ 50 mg/mL, pha loãng với

dung dịch đệm phosphat pH 6,8 thành nồng độ 2 mg/mL để làm phản ứng, nồng độ cao chiết trong phản ứng sẽ là 200 $\mu\text{g/mL}$. Phản ứng được tiến hành trên đĩa 96 giếng, hỗn hợp phản ứng bao gồm (tổng thể tích 200 μL): 30 μL đệm phosphat pH 6,8; 50 μL L-Tyrosin nồng độ 1,5 mM; 20 μL mẫu thử (cao chiết hoặc chất chuẩn acid kojic) và 100 μL Tyr nấm (100 U/mL). Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 10 phút và độ hấp thụ được đo trên máy đọc ELISA theo kinetic ở bước sóng 490 nm trong 15 phút (mỗi 1,5 phút đọc 1 lần). Độ hấp thụ không có mẫu thử được sử dụng làm mẫu chứng. Chứng dương được sử dụng là acid kojic. Phần trăm ức chế (I) hoạt độ tyrosinase được tính như sau:

$$I (\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Trong đó: - A: Sự thay đổi mật độ quang trung bình trong 1 phút của mẫu chứng.

- B: Sự thay đổi mật độ quang trung bình trong 1 phút của mẫu thử.

2.2.3. Phương pháp xác định giá trị IC_{50} :

Lựa chọn các cao chiết có % ức chế > 35% ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ để tiếp tục xác định giá trị IC_{50} . Pha các cao chiết thành các dải nồng độ khác nhau tùy thuộc vào % ức chế đã xác định được. Với các cao chiết có giá trị ức chế < 50%, pha dải nồng độ (4,0; 2,0; 1,0; 0,5 và 0,25 mg/mL); Với các cao chiết có giá trị ức chế từ 50% trở lên, pha dải nồng độ (2,0; 1,0; 0,5; 0,25 và 0,125 mg/mL). Tiến hành tương tự như mục 2.2.2.

Giá trị IC_{50} được xác định bằng phần mềm GraphPad Prism 10.0 với khoảng tin cậy 95%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả sàng lọc khả năng ức chế enzym tyrosinase

Đã chuẩn bị được cao chiết ethanol của 70 dược liệu để nghiên cứu sàng lọc khả năng ức chế enzym tyrosinase. Kết quả sàng lọc được (Bảng 1) cho thấy, có 26 cao chiết có tác dụng ức chế > 35% hoạt tính Tyr, với 15 cao chiết có tác dụng ức chế > 50%, trong số đó có 6 cây có tác dụng ức chế hơn 80%. Như vậy, tính theo tổng số cao dược liệu được đánh giá thì có 35,7% mẫu có tác dụng ức chế > 35%, trong đó chỉ có 8,6% mẫu có tác dụng ức chế > 80% ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$. 26 mẫu cao chiết tiềm năng này sẽ được xác định giá trị IC_{50} .

Bảng 1. Phần trăm ức chế enzym Tyrosinase của các cao chiết ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$

STT	Tên dược liệu	Tên khoa học	Bộ phận dùng	Nơi thu hái	Thời điểm thu hái	% ức chế Tyr ở 200 $\mu\text{g/mL}$
1	Ba kích	<i>Morinda officinalis</i>	Rễ	Hưng Yên	9/2018	$3,2 \pm 0,5$
2	Bạch chi nam	<i>Millettia pulchra</i>	Thân rễ	Lào Cai	4/2019	$5,9 \pm 1,3$
3	Bạch hoa xà thiệt thảo	<i>Hedyotis diffusa</i> Willd.	Phần trên mặt đất	Thanh Hóa	3/2019	$44,1 \pm 2,4$
4	Bách hợp	<i>Lilium spp.</i>	Củ	Lào Cai	3/2019	$11,0 \pm 0,9$
5	Bạch trạch	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz.	Thân rễ	Lào Cai	3/2019	$11,6 \pm 1,0$

STT	Tên dược liệu	Tên khoa học	Bộ phận dùng	Nơi thu hái	Thời điểm thu hái	% ức chế Tyr ở 200 µg/mL
6	Bảy lá một hoa	<i>Paris</i> spp.	Củ	Hà Giang	3/2018	10,5 ± 1,5
7	Bình vôi núi cao	<i>Stephania brachyandra</i> Diels	củ	Lào Cai	2/2018	43,2 ± 0,7
8	Bộ mây	<i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> Turcz	Cành lá	Thanh Hóa	5/2018	9,6 ± 1,2
9	Cải cần	<i>Corydalis balansae</i> Prain	Cả cây	Cao Bằng	8/2018	9,6 ± 0,9
10	Cam thảo	<i>Glycyrrhiza</i> spp.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	2/2018	81,3 ± 0,7
11	Câu đằng	<i>Uncaria</i> spp.	Phân trên mặt đất	Lai Châu	3/2020	47,8 ± 1,1
12	Câu tích	<i>Cibotium barometz</i> (L.) J. Sm.	Rễ	Sơn La	2/2018	18,3 ± 0,8
13	Châu thụ	<i>Gaultheria fragrantissima</i> Wall.	Cành lá	Hà Giang	8/2018	21,0 ± 1,4
14	Củ mài	<i>Dioscorea persimilis</i> Prain et Burkill	Củ	Hà Nội	4/2019	82,0 ± 1,4
15	Cúc tần	<i>Pluchea indica</i> (L.) Less.	Cành lá	Hòa Bình	5/2018	17,9 ± 1,5
16	Dâm bụt	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Cành lá	Nghệ An	5/2018	(-16,9) ± 1,7
17	Đan sâm	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Rễ	Sơn La	3/2019	59,9 ± 2,0
18	Dâu tằm	<i>Morus alba</i> L.	Lá, cành	Bắc Giang	9/2018	97,5 ± 0,3
19	Diệp hạ châu đắng	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	2/2019	9,8 ± 1,4
20	Đỉnh lăng	<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms	Rễ	Hung Yên	9/2018	7,29 ± 1,3
21	Đơn mặt trời	<i>Excoecaria cochinchinensis</i> Lour.	Cành lá	Hà Giang	4/2018	55,4 ± 1,4
22	Giáo cô lam 5 lá	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.)	Cành lá	Vĩnh Phúc	4/2018	50,7 ± 0,2
23	Hạ khô thảo	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Phân trên mặt đất	Lào Cai	9/2018	42,8 ± 0,7
24	Hà thủ ô độ	<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.)	Thân rễ	Lai Châu	8/2018	56,2 ± 1,6
25	Hoa đại trắng	<i>Plumeria rubra</i> L.	Hoa	Phủ Yên	8/2018	11,1 ± 1,2
26	Hoàng kỳ	<i>Astragalus membranaceus</i>	Thân rễ	Lào Cai	9/2018	12,9 ± 1,6
27	Hồng hoa	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Nụ hoa	Lạng Sơn	2/2018	6,1 ± 0,3
28	Hương nhu tía	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	6/2018	58,4 ± 1,4
29	Hương nhu trắng	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lá	Hung Yên	3/2018	10,1 ± 0,3
30	Hương phụ	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Củ	Hà Nội	8/2018	0,6 ± 1,5
31	Mạch môn đông	<i>Ophiopogon japonicus</i> Ker. Gawl.	Củ	Hung Yên	9/2018	97,1 ± 0,7
32	Ngọc nữ biên	<i>Clerodendrum inerme</i> (L.) Gaertn.	Lá	Thanh Hóa	5/2018	(-3,0) ± 0,6
33	Ngũ gia bì gai	<i>Acanthopanax trifoliatum</i> (L.) Voss.	Vỏ thân, vỏ rễ	Lào cai	2/2018	(-10,2) ± 0,5
34	Nhài	<i>Jasminum sambac</i> (L.) Aiton	Cành lá	Hung Yên	4/2019	(-14,6) ± 1,7
35	Nho dại	<i>Vitis vinifera</i> L.	Cành lá	Hà Nội	9/2018	114,9 ± 0,6
36	Rau đắng đất	<i>Glinus oppositifolius</i>	Phân trên mặt đất	Thanh Hóa	5/2019	21,3 ± 1,7
37	Sả chanh	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.)	Thân, lá	Hà Nội	3/2019	14,9 ± 2,3
38	Tâm gửi cây dâu	<i>Scurrula parasitica</i> L.	Cả cây	Hung Yên	9/2018	22,8 ± 1,6
39	Thảo quyết minh	<i>Senna tora</i> (L.) Roxb.	Hạt	Sơn La	2/2018	(-20,4) ± 1,6
40	Viễn chí	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd	Rễ	Lai Châu	3/2019	(-1,9) ± 0,9
41	Xạ can	<i>Belamcanda chinensis</i> Lem	Thân rễ	Hung Yên	8/2018	41,6 ± 2,9
42	Xuyên khung	<i>Ligusticum wallichii</i> Franch.	Củ	Lào Cai	2/2018	25,8 ± 0,9
43	Actiso	<i>Cynara scolymus</i> L.	Hoa	Lâm Đồng	8/2023	41,9 ± 0,6
44	Bạc hà	<i>Mentha arvensis</i> L.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	10/2023	11,9 ± 0,7
45	Bạch giới tử	<i>Sinapis alba</i> L.	Hạt	Lào Cai	12/2023	37,5 ± 3,5
46	Bán chi liên	<i>Scutellaria barbata</i> D. Don.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	12/2023	35,7 ± 0,8
47	Bồ bồ	<i>Adenosma indianum</i> (Lour.)	Phân trên mặt đất	Lào Cai	11/2023	28,9 ± 1,4
48	Bồ công anh thân lùn.	<i>Lactuca indica</i> L.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	12/2023	(-7,9) ± 1,8
49	Bồ kết	<i>Gleditsia australis</i>	Quả	Hải Phòng	10/2023	9,8 ± 0,7
50	Cát cánh	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.)	Thân rễ	Lào Cai	01/2024	11,5 ± 1,9
51	Cát sâm	<i>Callerya speciosa</i> (Champ.) Schot	Thân rễ	Yên Bái	12/2023	7,4 ± 0,8
52	Chè	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Lá	Vĩnh Phúc	10/2023	73,9 ± 1,2
53	Cốt khí củ	<i>Reynoutria japonica</i> Houtt.	Rễ	Lào Cai	10/2023	96,3 ± 1,8
54	Cúc hoa vàng	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	Hoa	Hà Nội	12/2023	46,1 ± 1,4
55	Đảng sâm	<i>Codonopsis javanica</i> (Blume.) Hook.f.	Thân rễ	Lào Cai	11/2023	3,2 ± 0,9
56	Danh dành	<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis.	Quả	Hà Nội	12/2023	8,6 ± 1,0
57	Dây đau xương	<i>Tinospora sinensis</i> (Lour.) Merr.	Phân trên mặt đất	Hà Nội	10/2023	(-2,7) ± 0,4
58	Dây thìa canh	<i>Gymnema sylvestre</i> (Retz.)	Phân trên mặt đất	Lào Cai	10/2023	4,9 ± 1,4
59	Đỗ trọng	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Vỏ	Lào Cai	11/2023	2,3 ± 0,6
60	Đỗ trọng nam	<i>Parameria laevigata</i>	Vỏ thân	Lào Cai	11/2023	22,0 ± 1,2
61	Gắc	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng.	Vỏ hạt	Hà Nội	12/2023	3,1 ± 1,4
62	Hoắc hương	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco)	Nụ hoa	Hung Yên	12/2023	25,9 ± 1,4
63	Hòe	<i>Sophora japonica</i> L.J	Hoa	Thái Bình	12/2023	68,3 ± 0,1
64	Hồi	<i>Illicium verum</i> Hook.f.	Quả	Lạng Sơn	12/2023	17,4 ± 0,9
65	Kim tiền thảo	<i>Desmodium styracifolium</i>	cành lá	Lào Cai	11/2023	83,0 ± 1,0
66	Mô quạ	<i>Cudrania cochinchinensis</i> (Lour)	Lá	Lạng Sơn	12/2023	47,0 ± 0,9
67	Ngải cứu	<i>Artemisia argyi</i> H.Lév.	Lá	Hà Nội	3/2024	47,6 ± 0,3
68	Nghệ	<i>Cucuma longa</i> L.	Củ	Lào Cai	11/2023	39,3 ± 1,7
69	Nha đam	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	thịt lá	Hà Nội	1/2024	(-19,7) ± 1,0
70	Nhân trần	<i>Adenosma caeruleum</i> R.Br.	phân trên mặt đất	Hà Nội	1/2024	14,7 ± 0,6

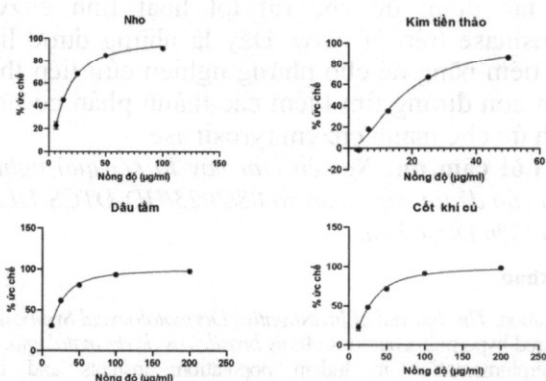
3.2. Kết quả xác định IC_{50} trên enzym Tyrosinase của các cao chiết tiềm năng

Để xác định giá trị IC_{50} của các cao chiết tiềm năng (lựa chọn các cao chiết có tác dụng ức chế Tyr > 35% ở nồng độ sàng lọc), đã đánh giá khả năng ức chế Tyr của các cao chiết ở dải 5 nồng độ khác nhau tùy thuộc vào khả năng ức chế mạnh hay yếu hơn khi sàng lọc. Giá trị IC_{50} được trình bày trong Bảng 2. Cao chiết cành lá nho dại có giá trị IC_{50} nhỏ nhất (14,6 $\mu\text{g/mL}$); cao chiết

kim tiền thảo và dâu tằm có giá trị IC_{50} lần lượt là 17,12 và 19,8 $\mu\text{g/mL}$; cao chiết cốt khí củ có khả năng ức chế Tyr yếu hơn 3 cao chiết trên với IC_{50} là 26,61 $\mu\text{g/mL}$. Đường cong ức chế Tyr của các chất này được biểu diễn trong Hình 1. Các cao chiết ức chế Tyr yếu hơn nữa là củ mài có giá trị IC_{50} 52,7 $\mu\text{g/mL}$; hoa hòe có IC_{50} là 81,4 $\mu\text{g/mL}$. 20 cao chiết còn lại có giá trị IC_{50} cao (có 3 cao xấp xỉ 100 $\mu\text{g/mL}$, 17 cao có giá trị xung quanh 200 $\mu\text{g/mL}$).

Bảng 2. Giá trị ức chế Tyr IC_{50} của các dược liệu tiềm năng

STT	Tên dược liệu	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	STT	Tên dược liệu	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Chứng dương	Acid Kojic	49,7 (43,2-56,8)	13	Hà thủ ô đỏ	131,6 (112,3-154,4)
	HQ	30,6 (24,1-38,8)	14	Hòe	81,4 (64,7-100,6)
1	Actiso	151,7 (139,7-183,2)	15	Hương nhu tía	147,6 (123,5-184,7)
2	Bạch giới tử	> 400	16	Kim tiền thảo	17,1 (15,9-18,4)
3	Bạch hoa xà thiệt thảo	197,9 (176-226,2)	17	Mỏ quạ	206 (179,7-238,2)
4	Bán chi liên	165 (137,6-204,2)	18	Ngải cứu	216,9 (188,8-250,9)
5	Cam thảo	96,7 (90,4-103,5)	19	Nghệ	203,4 (184,5-225,2)
6	Câu đằng	196,4 (158,1-257,7)	20	Nho dại	14,6 (13,7-15,5)
7	Chè	100,2 (94,52-106,3)	21	Bình vôi núi cao	271,2 (241,3-309,0)
8	Cốt khí củ	26,6 (24,6-28,8)	22	Đan sâm	254,8 (180,1-398,1)
9	Củ mài	52,7 (48,9-56,8)	23	Giảo cổ lam 5 lá	242 (194,9-321,4)
10	Cúc hoa vàng	193,6 (175,6-214,7)	24	Đơn mặt trời	137,2 (125,9-149,9)
11	Dâu tằm	19,8 (18,8-20,9)	25	Mạch môn đông	99,9 (90,6-112,6)
12	Hạ khô thảo	210,1 (175,8-253,1)	26	Xạ can	> 400



Hình 1. Đường cong ức chế Tyr của các dược liệu có tác dụng tốt nhất

Trong nghiên cứu này, chúng tôi có sử dụng 2 mẫu chứng dương là acid kojic và hydroquinon (HQ) để đánh giá IC_{50} (Bảng 2). Với acid kojic, giá trị IC_{50} là 49,7 $\mu\text{g/mL}$, tuy nhiên khả năng ức chế của acid kojic lại không tăng khi tăng nồng độ (ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$, acid kojic cũng chỉ ức chế 56,9% Tyr). HQ có giá trị IC_{50} là 30,6 μM (3,37 $\mu\text{g/mL}$), ở nồng độ 150 μM nó có khả năng ức chế đến 98% hoạt tính Tyr, đây là một chất ức chế Tyr mạnh. Acid kojic được sử dụng làm chứng dương trong rất nhiều các bài báo nghiên cứu về tác dụng ức chế tyr, với khoảng giá trị IC_{50} khá rộng: 192,3 $\mu\text{g/mL}$ [9]; 45,3 $\mu\text{g/mL}$ [10]; 2,84 $\mu\text{g/mL}$ [11]. HQ cũng thường được sử dụng làm mẫu chứng dương và giá trị IC_{50} cũng dao động 26 μM [12]; 70 μM [13].

Các nghiên cứu đã xác định thành phần hóa học chính có trong cành lá nho cũng giống như trong hạt, thịt quả và vỏ quả là các acid phenolic, flavonol, flavanol, stiben và anthocyanin; tuy nhiên các nghiên cứu trên thế giới về tác dụng dược lý lại chủ yếu đánh giá cao chiết từ hạt, vỏ hạt, thịt quả và thân cho thấy tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư, chống đái tháo đường, bảo vệ gan, chống viêm [14]. Đã có báo cáo về tác dụng của polyphenol trong cao chiết hạt nho đỏ chống lại bức xạ UV-B trên da chuột nhắt SKH-1 kiểu như chất chống nắng và điều hòa đáp ứng viêm và tự chết của da chuột [15]. Trong nghiên cứu trên lâm sàng cho thấy kem bôi ngoài da chứa cao chiết nho có tác dụng làm giảm lão hóa da mặt [16]. Một nghiên cứu khác gần đây cho thấy, cao chiết ethanol hạt nho có tác dụng ức chế Tyr với IC_{50} là 94,8 $\mu\text{g/mL}$ trong khi acid kojic có IC_{50} là 192,3 $\mu\text{g/mL}$ [9]. Như vậy, kết quả ức chế tyrosinase của cao chiết cành và lá nho rất tốt như trong đánh giá của chúng tôi cũng tương đương với tác dụng của hạt nho (IC_{50} đều $\sim \frac{1}{2}$ IC_{50} của acid kojic), rất tiềm năng trong nghiên cứu tiếp theo về khả năng ngăn ngừa sự hình thành melanin trên da.

Thành phần hóa học chính của kim tiền thảo là flavonoid và alcaloid, sau đó là terpenoi, steroid, phenol, phenylpropanoid, glycosid và một số tinh dầu. Các nghiên cứu đã chứng minh tác dụng sinh học của cây chủ yếu do nhóm hoạt chất flavonoid và alcaloid [17]. Trong y học cổ

truyền Việt Nam, kim tiền thảo là dược liệu được dùng để điều trị nhiễm khuẩn đường niệu, sốt, sỏi thận, bệnh tim mạch và viêm gan [18].

Ở Trung Quốc, thuốc nước kim tiền thảo được sử dụng để điều trị nhiều bệnh gồm thấp khớp, sốt, hen, sốt thương hàn, kiết lỵ, vết thương, sốt rét, viêm gan, ho ra máu...[17]. Nghiên cứu gần đây cho thấy các polyphenol trong các bộ phận khác nhau của kim tiền thảo có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và chống đái tháo đường [19]. Chưa tìm thấy tài liệu nào đánh giá tác dụng ức chế Tyr cũng như các tác dụng có liên quan đến chống bức xạ. Như vậy, đánh giá khả năng ức chế Tyr của cao chiết ethanol kim tiền thảo là một phát hiện mới, tiềm năng cho nghiên cứu tiếp theo về tác dụng chống nám, làm sáng da cũng như chống thâm trên rau củ.

Với dược liệu dâu tằm, trên thế giới đã có một số nghiên cứu về tác dụng ức chế Tyr cũng như ức chế tạo hắc tố (tích tụ melanin) của các bộ phận khác nhau cho thấy dược liệu này rất có tiềm năng: Cao chiết cành có tác dụng ức chế sự tổng hợp melanin trên dòng tế bào ung thư da B-16; ức chế sự tạo thành melanin trên mô hình chuột lang, chất tinh khiết 2,3',4,5'-tetrahydroxystilben (2-oxyresveratrol) có tác dụng ức chế Tyr cao (IC_{50} là 0,23 $\mu\text{g/mL}$) [20] và một số chất tinh khiết khác cũng có tác dụng ức chế Tyr rất tốt [21]. Cao chiết rễ có tác dụng ức chế tạo hắc tố trên dòng tế bào u ác tính B16F10 [22]. Cao chiết lá dâu tằm ức chế Tyr với IC_{50} là 54,1 $\mu\text{g/mL}$ (trên cơ chất l-tyrosin) và 32,2 $\mu\text{g/mL}$ (với cơ chất l-DOPA) tương đương với acid kojic (IC_{50} là 28,0 $\mu\text{g/mL}$ với cơ chất l-

DOPA), polyphenol là thành phần chính đóng vai trò trong tác dụng này [23]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy cao chiết ethanol cành lá dâu tằm có tác dụng ức chế Tyr rất tốt khi có giá trị IC_{50} là 19,8 $\mu\text{g/mL}$, tốt hơn acid kojic.

Cốt khí củ là một trong những dược liệu giàu hàm lượng resveratrol nhất. Thành phần hoá học chính là stilben, carbohydrat, procyanidin, flavan-3-ol, anthraquinon, phenylpropanoid, lignin oligomer, acid hydroxycinnamic, naphthalen và dẫn xuất. Thân rễ của các loài *Reynoutria* có hoạt tính chống oxy hóa mạnh [24], có nhiều tác dụng trên *in vivo* hay *in vitro* như chống xơ vữa động mạch, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, bảo vệ thần kinh, kháng virus, bảo vệ tim, làm đen tóc. Chưa tìm được tài liệu nào nghiên cứu về tác dụng của cốt khí củ trên ức chế Tyr nên có thể nói kết quả của chúng tôi là phát hiện khá mới, thêm một dược liệu có tiềm năng trong việc tìm kiếm các chất có tác dụng ức chế sự hình thành melanin.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã tìm thấy cao chiết ethanol cành lá nho dại, cao chiết cành lá kim tiền thảo và cao chiết rễ cốt khí củ, cũng như khẳng định thêm cao chiết cành lá dâu tằm có tác dụng ức chế rất tốt hoạt tính enzym tyrosinase trên *in vitro*. Đây là những dược liệu rất tiềm năng để cho những nghiên cứu tiếp theo trên con đường tìm kiếm các thành phần có hoạt tính ức chế mạnh enzym tyrosinase.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này là kết quả nghiên cứu của đề tài cấp cơ sở số 08/2023/HĐ-ĐTCS-DLSH của Viện Dược liệu.

Tài liệu tham khảo

1. Ortonne J. P., Bissett D. L. (2008), Latest insights into skin hyperpigmentation, *The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 13, 10-4.
2. Cestari T.F., Dantas L.P., Boza J.C. (2014), Acquired hyperpigmentations, *Anais brasileiros de dermatologia*, 89, 11-25.
3. Nouveau S., Agrawal D., Kohli M., (2016), Skin hyperpigmentation in Indian population: insights and best practice, *Indian Journal of Dermatology*, 61, 487-95.
4. Dorca S., Saranzal R. (2014), Pigmentary disorders: an insight, *Pigment International*, 1, 5-7.
5. He M., Fan M., Liu W., Li Y., Wang G. (2021), Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel kojic acid derivatives containing bioactive heterocycle moiety as inhibitors of tyrosinase and antibrowning agents, *Food Chemistry*, 362.
6. Nguyễn Khoa Hạ Mai, Nguyễn Thị Thanh Mai (2018), Hoạt tính ức chế enzym tyrosinase của một số cây thuốc Việt Nam và các hợp chất được phân lập từ cây mít dai, *Tạp chí khoa học - Đại học Thủ Dầu I*, 38, 120-123.
7. Nguyễn Hoàng Dũng, Nguyễn Lương Hiếu Hòa, Lê Văn Minh, Phùng Bảo Chi, Lê Quỳnh Loan (2018), Khảo sát hoạt tính ức chế tổng hợp hắc tố của cây hoa hòe (*Sophora japonica* L.) trên dòng tế bào bào u hắc tố B16F10 ứng dụng trong mỹ phẩm, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 17(1), 14-20.
8. Moon J.Y., Yim E.Y., Song G., Lee N.H., Hyun C.G. (2010), Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants, *Eurasian Journal of Biosciences* 4, 41-53.
9. Hashim F. J., Vichitphan S., Han J., Vichitphan K. (2021), Alternative approach for specific tyrosinase Inhibitor screening: Uncompetitive inhibition of Tyrosinase by *Moringa oleifera*, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4576.
10. Asadzadeh A., Sirous H., Pourfarzam M., Yaghmaei P., Afshin F. (2016), *In vitro* and in silico studies of the inhibitory effects of some novel kojic acid derivatives on tyrosinase enzyme, 19(2): 132.
11. Xie W., Zhang H., He J., Zhang J., Yu Q., Luo, C., Li S. (2017), Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase, 27(3): 530-532.
12. Neelev E., Fritch G., Fuller A., Wolfe J., Wright J., Flurkey W. (2009), Variations in IC_{50} Values with Purity of Mushroom Tyrosinase, *International Journal of Molecular*, 10(9): 3811-3823.
13. Chen Yun-Ru, Chiou Robin Y-Y, et al. (2009), Identification of an alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis, 57(6), 2200-2205.
14. Tabeshpour J., Mehri S., Shaejabi B., F., Hosseinzadeh H. (2018), Protective effects of *Vitis vinifera* (grapes) and one of its biologically active constituents, resveratrol, against natural and chemical toxicities: A comprehensive review, *Phytotherapy Research*, 32 (11): 2164-2190.
15. Filip A., Clichici S., Daicoviciu D. (2011), Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera* extracts on UVB induced skin damage in SKH-1 hairless mice, *Physiological Pharmacology*, 62, 385-392.
16. Moyano-Mendez J.R., Fabbrocini G., De Stefano D. (2014), Enhanced antioxidant effect of trans-resveratrol: potential of binary systems with polyethylene glycol and cyclodextrin, *Drug development and industrial pharmacy*, 40, 1300-1307.
17. Ma X., Zheng C., Hu C., Rahman K., Qin L. (2011), The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 314-332.
18. Tran T. D., Bui T. Q., Le T. A., Nguyen M. T., Hai N. T. T., Pham N. H., Phan M. N., Healy P. C., Pham N. B., Quinn R. J., Ph.T. Quy, Nth Triet, Nguyen H. N.,

Le N. H., Phung T. V., Nhung N. T. A (2021), Styracifoline from the Vietnamese plant *Desmodium styracifolium*: a potential inhibitor of diabetes-related and thrombosis-based proteins. *ACS Omega*, 6(36), 23211-23221. **19.** Opryshko V., Prokhach A., Akimov O., Riabushko M., Kostenko H., Kostenko V., Mishchenko A., Solovyova N., Kostenko V. (2024), *Desmodium styracifolium*: Botanical and ethnopharmacological insights, phytochemical investigations, and prospects in pharmacology and pharmacotherapy. *Helvicon*, 10(3), e25058. **20.** Lee K. T., Lee K. S., Jeong J. H., Jo B. K., Heo M. Y., Kim H. P. (2003). Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *Journal of Cosmetic Science*, 54(2), 133-142. **21.** Zhang L., Tao G., Chen J., Zheng Z. P. (2016). Characterization of a new flavone and tyrosinase inhibition constituents from the twigs of *Morus alba* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(9), 1130. **22.** Zheng Y., Lee E. H., Lee S. Y., Lee Y., Shin K. O., Park K., Kang I. J. (2023). *Morus alba* L. root decreases melanin synthesis via sphingosine-1-phosphate signaling in B16F10 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115848. **23.** Chaivana W., Sirithunvalug J., Somwongin S., Punvovai C., Laothaweerungsawat N., Marsup P., Neimkhum W., Yawooti A (2020). Enhancement of the antioxidant, anti-tyrosinase, and anti-hyaluronidase activity of *Morus alba* L. leaf extract by pulsed electric field extraction. *Molecules*, 8, 25(9), 2212. **24.** Nawrot-Hadzik I., Ślusarczyk S., Granica S., Hadzik J., Matkowski A. (2019). Phytochemical diversity in rhizomes of three *Reynoutria* species and their antioxidant activity correlations elucidated by LC-ESI-MS/MS analysis, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1136.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 4/2024 (Trang 217 - 221)

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE HUYẾT VÀ HẠ CHOLESTEROL HUYẾT CỦA CAO CHIẾT BIOVIP VÀ TOX-OFF TỪ RAU ĐẮNG ĐẤT TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT NHẮT TRẮNG BỊ TĂNG GLUCOSE GÂY BỞI ALLOXAN

**Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1,*}, Nguyễn Thị Phương¹, Lê Thị Xoan¹, Trần Thị Hồng Vân¹,
Nguyễn Thị Lý², Đỗ Thị Hà¹, Vũ Hương Thủy³, Nguyễn Huy Văn³, Trần Quang Lục³**

¹Viện Dược liệu; ²Bệnh viện Thể thao Việt Nam; ³Công ty Cổ phần Traphaco

*Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

(Nhận bài ngày 02 tháng 7 năm 2024)

Tóm tắt

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá tác dụng hạ glucose huyết và cholesterol huyết của cao chiết nước (**Biovip**) và cao chiết ethanol 80% (**Tox-off**) từ rau đắng đất (*Glinus oppositifolius* (L.) A. DC.) được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm Traphaco. Nghiên cứu cũng đánh giá độc tính cấp và xác định LD₅₀ của các cao chiết trên chuột nhắt trắng. Các kết quả chỉ ra rằng, các cao chiết từ rau đắng đất an toàn về độc tính cấp. Cụ thể, không xác định được giá trị LD₅₀ đường uống của Biovip khi cho chuột uống liều tối đa là 25,6 g/kg, trong khi đó cao chiết Tox-off có giá trị LD₅₀ là 21,73 g/kg. Trên mô hình chuột nhắt trắng bị tăng glucose huyết gây bởi alloxan, cao chiết Biovip (liều 470 mg/kg) và Tox-off (liều 470 và 940 mg/kg) đều có tác dụng hạ đáng kể glucose huyết. Hơn nữa, tất cả 4 lộ uống cao chiết Biovip và Tox-off (liều 470 và 940 mg/kg) đều làm giảm đáng kể khối lượng gan và nồng độ cholesterol huyết thanh bị tăng cao gây bởi alloxan. Những kết quả này cho thấy tiềm năng của rau đắng đất trong điều trị đái tháo đường thực nghiệm. Cần có những nghiên cứu sâu hơn để chứng minh cơ chế hạ glucose của rau đắng đất.

Từ khóa: Rau đắng đất, *Glinus oppositifolius*, Độc tính cấp, Hạ glucose huyết, Alloxan.

Summary

Antihyperglycemic and Hypolipidemic Activities of Biovin and Tox-off Extracts from *Glinus oppositifolius* (L.) A. DC. in Alloxan-Induced Diabetic Mice

The objective of this study is to evaluate the antihyperglycemic effect and hypolipidemic effect of the extracts of *Glinus oppositifolius* (L.) A. DC., provided by Traphaco Joint Stock Company. The present study is also aimed to assess the acute oral toxicity and to determine of LD₅₀ values of these extracts in mice. The acute toxicity study showed that the extracts from *Glinus oppositifolius* are relatively safe regarding acute toxicity. Specifically, the oral LD₅₀ value of the water extract (Biovip) could not be determined when given to mice at the maximum tolerated dose of 25.6 g/kg; while the ethanol extract (Tox-off) had an LD₅₀ value of 21.73 g/kg. In the hyperglycemia mice model induced by alloxan, both Biovip extract (dose of 470 mg/kg) and Tox-off extract (doses of 470 and 940 mg/kg) significantly lowered blood glucose levels. Moreover, all four groups treated with Biovip and Tox-off extracts (doses of 470 and 940 mg/kg) significantly reduced liver weight and serum cholesterol levels elevated by alloxan. These results show the potential of *Glinus oppositifolius* in the treatment of experimental diabetes. Further research is needed to prove the antihyperglycemic activity mechanism of this plant.

Keywords: *Glinus oppositifolius*, Acute toxicity, Antihyperglycaemic, Alloxan.

1. Đặt vấn đề

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh mạn tính phổ biến ở Việt Nam và các nước trên thế giới, ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân và để lại nhiều biến chứng nguy hiểm. Theo thống kê của Hiệp hội đái tháo đường Thế giới, năm 2021 toàn thế giới có 537 triệu người (trong độ tuổi 20-79) mắc bệnh đái tháo đường, dự kiến năm 2030 sẽ ở mức 643 triệu người và 783 triệu người vào năm 2045 [1]. Tại Việt Nam,

theo ước tính của Bộ Y tế, số người trong độ tuổi từ 20-79 mắc đái tháo đường sẽ tăng khoảng 78,5% trong giai đoạn 2017-2045 [2]. Sự thiếu hụt insulin không chỉ gây ra tình trạng tăng glucose huyết mà còn ảnh hưởng đến các quá trình chuyển hóa khác. Cụ thể là khi nồng độ insulin trong máu giảm làm kích thích phân giải lipid trong các mô mỡ và làm tăng lipid máu. Bên cạnh đó, tình trạng kháng insulin dẫn đến việc sản xuất quá mức ApoB48, gây rối loạn lipid