

## ĐÁNH GIÁ THÀNH PHẦN POLYPHENOL VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TYROSINASE CỦA CÁC DỊCH CHIẾT LÁ *CALLISIA FRAGRANS*

Đến tòa soạn 02-10-2023

Nguyễn Hoàng Khuê Tú<sup>1</sup>, Nguyễn Lâm Hải My<sup>1</sup>, Trương Huỳnh Anh Vũ<sup>2\*</sup>

1. Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học quốc tế, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

2. Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\* Email: truonghuynhanhvu@yahoo.com

### SUMMARY

#### EVALUATION OF POLYPHENOL CONTENT AND TYROSINASE INHIBITION CAPACITY OF *CALLISIA FRAGRANS* LEAF EXTRACTS

*Callisia fragrans* (*C. fragrans*) belongs to the family Commelinaceae and has wide applications in the pharmaceutical field. The leaves were extracted by distillation in 40% methanol. The volatile extract (M) was collected, while the extract remaining in the flask was fractionated with the obtained ethyl acetate extract (Y) and the remaining extract after passing ethyl acetate (B). Total polyphenols (TPCs) of extracts in (M), (Y) and (B) were determined spectrophotometrically using Folin Ciocalteu reagent, with Gallic acid used as standard. The TPCs of (M), (Y) and (B) were determined as  $4.7 \pm 0.22$  mg GAE/g,  $17.91 \pm 0.0031$  mg GAE/g,  $47.11 \pm 0.22$  mg GAE/g dry weight, respectively. By liquid chromatography – mass spectrum, gallic acid and 1-O-(E)-caffeoyl-4,6-di-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose were detected in (B). Furthermore, tyrosinase inhibition was detected in extract (B) by tyrosinase inhibition assay due to the highest TPC content, using kojic acid as standard due to its tyrosinase inhibitory ability. Relative inhibition of (B) was 17.29% and IC<sub>50</sub> was  $64.47 \pm 0.06$   $\mu$ g/mL, equivalent to 2/3 the potency of kojic acid. Research has also succeeded in creating microcapsules containing TPC. The study on *C. fragrans* contribute to the pharmaceutical field.

**Keywords:** *Callisia fragrans*; Total polyphenol content; Tyrosinase inhibitor activity.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Callisia fragrans* (*C. fragrans*) mọc ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Lá có hình elip, đầu nhọn, dài tới 25 cm và có màu xanh lục hoặc đỏ tía. *C. fragrans* có giá trị y học lớn trong điều trị các bệnh ngoài da, bong, rối loạn khớp, ngăn ngừa viêm nhiễm [1]. *C. fragrans* chứa nhiều loại hợp chất có hoạt tính sinh học cao [2, 3]. Trong các thành phần hoá học, polyphenol có rất nhiều hoạt tính sinh học có giá trị [4]. Dựa trên cấu trúc hóa học, các polyphenol được phân thành 4 nhóm chính bao gồm phenolic acid, flavonoid, stilbene và lignans [5]. Các phân nhóm này có đặc tính sinh học khác

nhau và đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các vi sinh vật gây bệnh [6]. Ngoài ra, một số nghiên cứu còn chỉ ra khả năng ức chế tyrosinase của một nhóm  $\alpha$ -keto chứa trong flavonoid [7].

Tyrosinase là một loại enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp sắc tố melanin và thường xuất hiện ở thực vật và động vật. Melanin là sắc tố có bản chất là một polyphenol và phân bố rộng rãi ở da, tóc, mắt của động vật và người, giúp bảo vệ da khỏi các yếu tố có hại như tia UV [8]. Mặc dù vậy nhưng mức độ tăng sắc tố melanin ngày càng cao có thể dẫn đến nguy cơ ung thư da, gây ra các đốm

đồi mồi, tàn nhang và các dạng tăng sắc tố khác. Vì vậy, việc nghiên cứu các chất ức chế tyrosinase là điều cần thiết và đáng được quan tâm, cụ thể, chúng tôi tiến hành đánh giá thành phần polyphenol và hoạt tính ức chế tyrosinase của các dịch chiết từ lá và bào chế viên vi nang chứa dịch chiết. Viên nang có hình cầu được làm từ các thành phần dễ phân hủy sinh học, chứa các chất có hoạt tính đặc biệt với các chất kém bền, dễ bay hơi [9]. Kết quả nghiên cứu sẽ là tiềm năng ứng dụng trong mỹ phẩm, thực phẩm, và dược phẩm.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Mẫu thử nghiệm

Lá *C. fragrans* được thu hái khi còn tươi, không bị hư hại và nhiễm vi sinh vật. Lá tươi được rửa kỹ dưới vòi nước để loại bỏ bụi bẩn và côn trùng, sau đó sấy khô trong không khí cho đến khi độ ẩm 10%.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp chiết và thu nhận dịch chiết

380 g lá khô được ngâm trong 1000 mL MeOH 40% và sau đó được chiết bằng phương pháp chưng cất. Sau khi thu phần trên cột (M), phần còn lại trong bình được chiết bằng ethyl acetat. Thu lớp ethyl acetat được gọi là B. Tất cả các dịch chiết (M, Y, B) đều được cô đặc trước khi làm thí nghiệm.

#### 2.2.2 Phương pháp xác định hàm lượng phenol tổng (TPC)

Cao khô thu được được hòa tan trong nước cất. Lấy 20  $\mu$ L dịch chiết cho vào 100  $\mu$ L Folin ciocalteu (FC) và trộn đều trong 5 phút, sau đó thêm 80  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%) vào. Sau đó, mẫu để trong tối ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau đó, các dịch chiết được đo ở bước sóng 765 nm (Synergy HT, BioTek Instruments). Đối với đường chuẩn, gallic acid được pha loãng ở các nồng độ khác nhau (31,25; 62,5; 125; 250  $\mu$ g/mL). TPC được xác định theo gallic acid (GAE) bằng công thức sau:

$$\text{TPC} = (c \times V) / m$$

Trong đó:

TPC: tổng hàm lượng phenol tính bằng mg GAE/g

c: nồng độ gallic acid phân bố từ đường chuẩn mg/mL

V: thể tích dịch chiết (mL)

m: khối lượng của dịch chiết (g)

#### 2.2.3 Phương pháp xác định thành phần

Để sàng lọc thành phần hoá học dịch chiết, phương pháp sắc ký lỏng-khối phổ được sử dụng. Mẫu thử được đưa vào máy Agilent 6475 triple quadrupole LC/MS (Agilent, Mỹ). Dựa vào việc phân tách các chất kết hợp với trọng lượng phân tử, một số chất được phát hiện.

#### 2.2.4 Phương pháp xác định chất ức chế đối với tyrosinase

Khả năng ức chế tyrosinase được thực hiện theo phương pháp và hoá chất theo Aldrich-Sigma (Mỹ). Trong đó, kojic acid được sử dụng làm chất đối chứng để xác định hoạt tính ức chế tyrosinase. 20  $\mu$ L đệm thử nghiệm tyrosinase pha loãng được thêm vào các giếng được đánh dấu là mẫu (S), kiểm soát chất ức chế (IC), tương ứng là kojic acid và gallic acid. Đối với mỗi giếng, thêm 50  $\mu$ L dung dịch tyrosinase có chứa 48  $\mu$ L dung dịch đệm tyrosinase và 2  $\mu$ L tyrosinase. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và ủ trong ở 25 °C/10 phút. Sau đó, chuẩn bị 30  $\mu$ L dung dịch cơ chất bao gồm 23  $\mu$ L đệm thử nghiệm tyrosinase, 2  $\mu$ L chất nền tyrosinase và 5  $\mu$ L chất tăng cường tyrosinase. Dung dịch này được trộn đều và thêm vào từng giếng. So màu ở bước sóng 510nm, 30 - 75 phút. Phần trăm ức chế tyrosinase tương đối được tính theo công thức sau:

% ức chế tyrosinase =  $\frac{[\text{Độ dốc của đường ức chế tyrosinase của chất kiểm soát ức chế} - \text{Độ dốc của đường ức chế tyrosinase của mẫu thử}]}{\text{Độ dốc của đường ức chế tyrosinase của chất kiểm soát chất ức chế}} \times 100$

#### 2.2.5 Phương pháp bào chế vi nang chứa dịch chiết

Phương pháp tạo vi nang theo một số nghiên cứu trước [10]. 5 g bột Na-alginate hòa tan trong 100 mL nước cất để tạo thành dung dịch Na-alginate (5%). Sau đó, 4 mL dịch chiết được thêm vào 6 mL dung dịch Na-alginate và trộn đều. Dung dịch  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M) được chuẩn bị bằng cách hòa tan 1,11g  $\text{CaCl}_2$  trong 100mL nước cất (có thể thêm

tween 80, nếu cần, để giảm sức căng bề mặt của dung dịch tạo keo, ngăn viên nang bị vỡ hoặc hòa tan trong khi các giọt của hỗn hợp dịch chiết và Na-alginate (5%) được nhỏ vào dung dịch  $\text{CaCl}_2$ . Các nang thu được đem sấy  $50^\circ\text{C}$  để bảo quản.

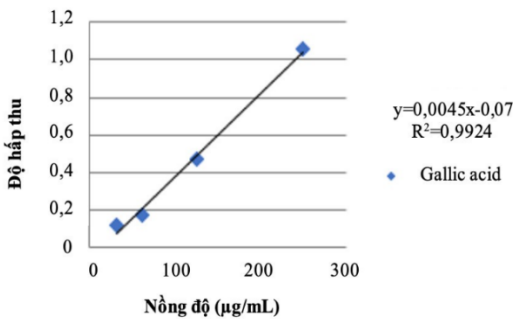
2.2.6 Phân tích thống kê

Tất cả các phân tích được thực hiện ít nhất trong ba lần và các kết quả thống kê được trình bày dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  SD. Tập dữ liệu thử nghiệm được phân tích bằng Microsoft excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tổng hàm lượng polyphenol trong các dịch chiết xuất khác nhau

Kết quả tổng hàm lượng phenol (TPC) trong dịch chiết lá *C. fragrans* được biểu thị bằng đương lượng gallic acid (mg GAE / g DW) và được tính toán từ phương trình hồi quy  $y = 0,0045x - 0,07$ . Như thể hiện trong hình 1, độ tuyến tính của đường chuẩn và các giá trị phân tán dẫn đến hệ số xác định cao ( $R^2 = 0,9924$ ). Kết quả này giúp cho việc định lượng được chính xác.



Hình 1. Đường chuẩn của Gallic acid

TPC của (M) là  $5 \pm 0,22$  mg GAE / g cao hơn TPC của chiết xuất ethanol được báo cáo là 3,21 mg GAE / g trước đây [3]. Hơn nữa, các nghiên cứu gần đây, tổng hàm lượng phenol bị ảnh hưởng bởi các dung môi chiết xuất khác nhau hoặc hỗn hợp dung môi với tỷ lệ khác nhau [11, 12]. TPC trong dịch chiết (Y) được xác định là  $18 \pm 0,0031$  mg GAE / g. Đối với B, nồng độ TPC thu được từ đường chuẩn là  $41 \pm 0,0028$  mg GAE / g trọng lượng khô. Thành phần phenol trong các phân đoạn thu được cao hơn so với chiết xuất methanol (M), cho thấy có rất nhiều phenol trong Y và B không bị bay hơi. Sản lượng các thành phần phenol thu được từ chiết xuất methanol bị ảnh hưởng bởi các dung môi khác nhau nhưng nhiệt độ, pH, thời gian chiết xuất,...[13].

3.2. Kết quả xác định thành phần

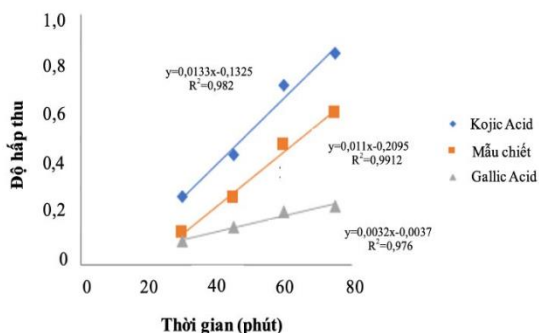
Do phần dịch chiết (B) có hoạt tính cao nhất nên được dùng để xác định thành phần trong polyphenol tổng. Với sự kết hợp giữa khả năng phân tách chất của sắc ký lỏng và khả năng cho biết trọng lượng phân tử hay số khối của khối phổ bằng cách sử dụng chế độ quét. Kết quả như trong bảng 1. Dựa vào phân tích sắc ký lỏng – khối phổ, gallic acid và 1-O-(E)-caffeoyl-4,6-di-O-galloyl-β-D-glucopyranose được sàng lọc. 1-O-(E)-caffeoyl-4,6-di-O-galloyl-β-D-glucopyranose là 1 tannin thủy phân ngoài gallic acid. Như vậy, dịch chiết *C. fragrans* có các thành phần có hoạt tính sinh học nên cần được quan tâm. Hiện nay, trong nước cũng như trên thế giới, các nghiên cứu về *C. fragrans* còn quá ít.

Bảng 1. Kết quả sắc ký lỏng – khối phổ

| STT | Thời gian lưu | λmax                   | M.W           | MS <sup>+</sup> | Tên chất                                            |
|-----|---------------|------------------------|---------------|-----------------|-----------------------------------------------------|
| 1   | 8,547         | 201,1; 232;19; 326,21  | Chưa xác định | 824,63          | Chưa xác định                                       |
| 2   | 10,253        | 215,03; 271,40; 357,71 | Chưa xác định | 828,75          | Chưa xác định                                       |
| 3   | 10,970        | 244,55; 314,90         | 170,12        | 226,00          | Gallic acid                                         |
| 4   | 13,673        | 243,81; 326,19         | 484,40        | 475,97          | 1-O-(E)-caffeoyl-4,6-di-O-galloyl-β-D-glucopyranose |
| 5   |               | 244,14; 326,46         | Chưa xác định | 586,45          | Chưa xác định                                       |

### 3.3. Kết quả xác định ức chế đối với tyrosinase

Kết quả xác định khả năng ức chế tyrosinase (Hình 2), tỷ lệ phần trăm ức chế tương đối của (B) và gallic acid được tính lần lượt là 17,29% và 75,94%. Sự ức chế tương đối dựa trên độ dốc của phương trình hồi quy của kiểm soát chất ức chế, mẫu, gallic acid được biểu thị bằng  $y = 0,0133x - 0,1325$  ( $R^2 = 0,982$ ),  $y = 0,011x - 0,2095$  ( $R^2 = 0,9912$ ) và  $y = 0,0032x + 0,0037$  ( $R^2 = 0,976$ ), tương ứng. Giá trị  $IC_{50}$  được sử dụng làm nồng độ của chất ức chế để biểu thị độ mạnh của chất ức chế,  $IC_{50}$  của mẫu và chất kiểm soát chất ức chế (kojic acid) và gallic acid được xác định theo thứ tự tương ứng là  $64,47 \pm 0,06 \mu\text{g} / \text{mL}$ ,  $47,54 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  và  $155,97 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$ .



Hình 2. Ảnh hưởng của các hợp chất polyphenol chiết xuất từ *C. fragrans* đối với hoạt động ức chế tyrosinase

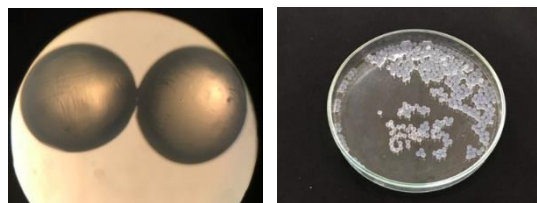
Thông thường, giá trị  $IC_{50}$  thấp hơn thì hoạt động ức chế tyrosinase càng cao, do đó,  $IC_{50}$  của chiết xuất lớn hơn  $IC_{50}$  của kojic acid thì khả năng ức chế tyrosinase yếu hơn và được ước tính là bằng hai phần ba tác dụng kojic acid. Do đó, dịch chiết sẽ được tăng nồng độ để có nhiều hoạt tính hơn. Giá trị  $IC_{50}$  của gallic acid lớn hơn nhiều so với  $IC_{50}$  của mẫu *C. fragrans* và kojic acid. Sự ức chế hoạt tính tyrosinase của gallic acid rất yếu, phù hợp với các nghiên cứu trước đây [14]. Do đó, tác động ức chế tyrosinase trong dịch chiết là do các polyphenol khác, chứ không phải gallic acid. Các polyphenol tiềm năng trong dịch chiết sẽ được khai thác.

### 3.4. Kết quả bào chế vi nang chứa dịch chiết

Viên nhỏ hình cầu, kích thước  $1,90 \pm 0,09 \text{ mm}$ . Vì tất cả các viên nang nhỏ đều có hình dạng hình cầu và kích thước đường kính tương tự nhau và bề mặt

vỏ viên nang hơi nhẵn (Hình 3), do đó, kết quả tốt khi thực hiện phương pháp bao gói dịch chiết trong 3% Na-alginate.

Những hạt này được làm khô ở nhiệt độ phòng. Các hạt này được đem định lượng để kiểm tra xem TPC của chiết xuất B có bị mất đi hay không sau khi thực hiện vi bao. Hàm lượng phenolic trong viên nang được tính theo lượng gallic acid (mg GAE / g DW) dựa trên đường chuẩn của gallic acid. TPC được tính bằng  $0,21 \pm 0,01 \text{ mg GAE} / \text{g}$  trọng lượng khô / 1 vi nang. Do đó, nghiên cứu có thể đóng gói TPC trong vi bao.



Hình 3. Các hạt nhỏ được thu thập từ quá trình vi nang. A) Quan sát 40X hiển thị các viên nang nhỏ dưới kính hiển vi soi nổi. B) Quan sát viên nang nhỏ bằng mắt thường

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tìm các phân đoạn có hàm lượng polyphenol, khả năng ức chế tyrosinase của dịch chiết lá của *C. fragrans*. Nghiên cứu tìm điều kiện để tạo vi nang chứa cao chiết được liệu. Đặc biệt, dịch chiết được sàng lọc có gallic acid và 1-O-(E)-caffeoyl-4,6-di-O-galloyl-β-D-glucopyranose. Các nghiên cứu sâu về dược liệu này cần được nghiên cứu và phát huy để ứng dụng dược phẩm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chernenko T. V., Glushenkova N. T., Ul'chenko A. I., Redzhepov D., (2007). Chemical investigation of *Callisia fragrans*. *Chemistry of Natural Compounds*, **43**(3), 253–254.
- [2] Sohafy E., Nassra S. M., D'Urso R. A., Piacente G., Sallam S., (2021). Chemical profiling and biological screening with potential anti-inflammatory activity of *Callisia fragrans* grown in Egypt. *Natural Product Research*, **35**(23), 5521–5524.
- [3] Olennikov D. N., (2008). Chemical composition of *Callisia fragrans* juice 1. Phenolic

compounds. *Chemistry of Natural Compounds*, **44(6)**, 776-777.

[4] Jia W., Zhou L. L., Zhou L. P., Shen Z., (2023). Nano-based drug delivery of polyphenolic compounds for cancer treatment: progress, opportunities, and challenges. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **16(1)**, 101.

[5] Samah M., Sohafy E., Nassra R. A., D'Urso G., Piacente S., Sallam S. M., (2020). Chemical profiling and biological screening with potential antiinflammatory activity of *Callisiafragrans* grown in Egypt. *Natural Product Research*, **35(23)**, 5521-5524.

[6] Vaquero M. J. R., Alberto M. R., Nadra M., (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18**, 587–593.

[7] Badria F. A., Elgayyar M. A., (2001). A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, **140**, 267–271.

[8]. Nazir Y., Rafique H., Roshan S., Shamas S., Ashraf Z., Rafiq M., Tahir T., Qureshi Z. U., Aslam A., Asad M. H. H. B., (2022). Molecular docking, synthesis, and tyrosinase inhibition activity of acetophenone amide: Potential inhibitor of melanogenesis. *BioMed Research International*, **2022**, 1-10.

[9]. Butreddy A., Gaddam R. P., Kommineni N., Dudhipala N., Voshavar C., (2021). PLGA/PLA-

based long-acting injectable depot microspheres in clinical use: Production and characterization overview for protein/peptide delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, **22(16)**, 8884.

[10] Lopes S., Bueno L., Júnior F. A., Finkler C., (2017). Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **89(3)**, 1601–1613.

[11] Le T., Cao D. K., Pham T. V., Huynh T. D., Ta N. T. A., Nguyen N. T., Nguyen H. T., Le H. H., Bui A. V., Truong D. H., (2018). Changes in total phenol, flavonoid contents and anti-*Lactobacillus* activity of *Callisia fragrans* due to extraction solvent. *AIP Conference Proceedings*, **1954(1)**, 1-7.

[12] Đái Thị Xuân Trang, Trần Chí Linh, Nguyễn Trọng Tuân, (2020). Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng viêm in vitro của các cao chiết lá cây cò sen (*Milusa velutina*). *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **1(25)**, 40-45.

[13] Stalikas C. D., (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, **30(18)**, 3268-3295.

[14] Nithitanakool S., Pithayanukul P., Bavovada R., Saparpakorn P., (2009). Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of thai mango seed kernel extract. *Molecules*, **14**, 257-265.