

KHẢO SÁT MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC IN VITRO VÀ QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT HOẠT CHẤT TỪ LÁ CÂY CÙ ĐỀ BREYNIA VITIS-IDAEA (BURM.F.) C. E. C. FISCHER

● LÊ XUÂN TIẾN - LÊ HẢI HÀ LINH - NGUYỄN KIM MINH TÂM

TÓM TẮT:

Bài viết khảo sát một số hoạt tính sinh học In Vitro và quy trình tách chiết hoạt chất từ lá cây cù đề (Burm.f.) C.E.C. Fischer. Kết quả cho thấy cao ethyl acetate cho hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất [IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 86.5 ± 0.5 so với $IC_{50} = 11.3 \pm 0.0$ của vitamin C], trong khi cao n-butanol ức chế tyrosinase mạnh nhất [IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 650 ± 10 so với $IC_{50} = 85 \pm 1.5$ của arbutin]. Bên cạnh đó, bài viết còn xây dựng quy trình chiết cao sử dụng dung môi ethanol (chiết 2 lần với 7 g nguyên liệu ban đầu, dung môi ethanol/nước tỉ lệ 1:1, tỷ lệ $m_{\text{nguyên liệu}}:V_{\text{dung môi}} = 1:5 \text{ g/mL}$, chiết ở 50°C trong thời gian 30 phút). Loại mẫu dịch chiết bằng phương pháp tạo tủa với $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ở 0°C . Hiệu suất quá trình loại mẫu đạt 46.88%.

Từ khóa: *Breynia vitis-idaea*, DPPH, tyrosinase, lá cây cù đề, tách chiết hoạt chất.

1. Giới thiệu

Cù đề (*Breynia vitis-idaea*) là một loài thực vật mọc dại đã được sử dụng như vị thuốc dân gian ở nhiều nước châu Á, như: Ấn Độ, Trung Quốc, Malaysia. Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu từ Khoa Kỹ thuật Hóa học, Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh là nhóm đầu tiên tiến hành chiết tách và phân lập hoạt chất hóa học từ cây này. Kết quả thu được một số chất là dẫn xuất của arbutin, một hợp chất hiện được dùng nhiều trong các sản phẩm làm trắng da. Đề tài này tiếp tục nghiên cứu trên *Breynia vitis-idaea* nhằm đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa cũng như khả năng làm trắng da của cao chiết và hoạt chất phân lập từ lá cù đề, đồng thời xây dựng quy trình chiết và tinh chế hoạt chất 6-O-benzoyl arbutin.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chiết cao tổng và cao thành phần

Bột lá cù đề được chiết kiệt 5 lần với ethanol (EtOH) (1 g/5 mL) ở nhiệt độ 50°C , trong 1 giờ. Dịch chiết được cô quay thu cao tổng. Cao tổng chiết lần lượt với các dung môi từ không phân cực đến phân cực [n-hexane, ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH), nước] để thu các cao thành phần và tách các cụm hoạt chất khác nhau.

2.2. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa

Dựa trên khả năng đánh bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Tiến hành theo phương pháp của Brand-Williams (1995) có cải tiến. Cho 750 μL dung dịch DPPH (30 $\mu\text{g/mL}$ MeOH) vào 500 μL dung dịch chứa cao cù đề ở các nồng độ khác nhau hay dung dịch chuẩn

(ascorbic acid). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 phút. Đo OD 517 nm IC₅₀ được tính dựa trên % gốc tự do bị đánh bắt ở 6 nồng độ cao khác nhau.

2.3. Đánh giá khả năng kháng làm trắng da

Dựa trên khả năng ức chế tyrosinase, enzyme chính xúc tác quá trình tổng hợp melanin, sắc tố làm sạm màu da.

Tiến hành theo phương pháp của Masamoto (2003). Dùng L-DOPA 0.8 mM làm cơ chất cho tyrosinase và β -arbutin làm chứng dương. Hòa tan mẫu trong dung dịch DMSO 5%. Chuẩn bị 4 hỗn hợp: A (0 μ L đệm sodium phosphate pH 6.8 + 150 μ L tyrosinase + 150 μ L L-DOPA + 900 μ L DMSO 5%); B (150 μ L đệm + 0 μ L tyrosinase + 150 μ L L-DOPA + 900 μ L DMSO 5%); C (0 μ L đệm + 150 μ L tyrosinase + 150 μ L L-DOPA + 900 μ L mẫu); D (150 μ L đệm + 0 μ L tyrosinase + 150 μ L L-DOPA + 900 μ L mẫu). Ủ các hỗn hợp trong 10 ở 25°C. Đo OD ở bước sóng 475 nm. Phản trình ức chế tyrosinase được tính theo công thức = [(ODA - ODB) - (ODC - ODD)] x 100 / (ODA - ODB)

2.4. Định lượng hàm lượng phenol tổng

Caô chiết được hòa tan trong dung môi DMSO thành các nồng độ thích hợp. Lấy 40 μ L dịch thêm vào 200 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau 5 phút, thêm 3160 μ L nước và 600 μ L dung dịch Na₂CO₃ 20%, lắc đều, siêu âm trong 30 phút. Đo OD của ở bước sóng 760 nm. Gallic acid được dùng làm chất chuẩn. Hàm lượng phenol tổng được biểu diễn theo mg đương lượng gallic acid trong 1g nguyên liệu chiết.

2.5. Xây dựng quy trình chiết cao từ lá củ dền và tinh chế hợp chất 6-O-benzoyl arbutin

Nhằm thu khối lượng cao chiết và hàm lượng phenol tổng trong cao chiết là cao nhất. Với định hướng ứng dụng các chất phân lập được vào sản phẩm mỹ phẩm nên chúng tôi chọn dung môi ethanol là dung môi khá an toàn và ít độc. Các thông số được khảo sát bao gồm nồng độ dung môi ethanol, thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỷ lệ chiết ($m_{\text{nguyên liệu}} : V_{\text{dung môi}}$). (Bảng 1).

2.6. Xây dựng quy trình tinh chế hợp chất 6-O-benzoyl arbutin

Caô chiết thu được có màu nâu đen, chứa nhiều tạp chất. Do đó, cần loại màu dịch chiết bằng phương pháp tạo tủa với Ca(OH)₂, sau đó thực hiện trao đổi ion để loại ion Ca²⁺. Nhựa cation được sử dụng có tính acid mạnh chứa nhóm chức sulfoxyl (-SO₃H).

Bảng 1. Các điều kiện khảo sát chiết cao ethanol

Độ cồn (%)	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ nguyên liệu - dung môi (g/mL)
10	15	30	1:4
30	30	40	1:5
50	60	50	1:6
70	120	60	1:7
90	180	70	1:8
		80	1:9
			1:10

Hạt nhựa dạng gel, màu hổ phách, hình cầu, kích thước hạt 0,315 - 1,25 mm. Công suất trao đổi Na⁺ thấp nhất là 1,6eq/L.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới điều kiện loại màu là nồng độ dịch chiết, hàm lượng Ca(OH)₂ và nhiệt độ của phản ứng. (Bảng 2).

Bảng 2. Các điều kiện khảo sát trong quy trình loại màu

Nồng độ cao (g/L) ^a	Tỷ lệ Ca(OH) ₂ - dịch chiết*	Nhiệt độ (°C)
20	1:2	0
40	1:1	10
60	2:1	20
80	3:1	30
100		40
		50

* Nồng độ dịch chiết tối ưu trong khảo sát (a)

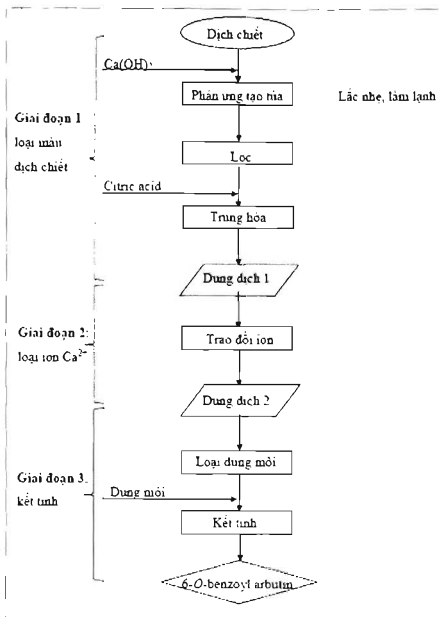
Kết tinh hợp chất 6-O-benzoyl arbutin bằng dung môi nước và ethanol. (Hình 1).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khả năng kháng oxy hóa

Các gốc tự do sinh ra trong quá trình chuyển hóa của sinh vật có thể gây những rối loạn như tiểu đường, ung thư, các bệnh trên gan thận. Các chất được gọi là kháng oxy hóa sẽ có khả năng đánh bắt gốc tự do, điển hình như DPPH. DPPH có thể liên kết với các nhóm hydroxyl. Khả năng đánh bắt gốc DPPH của cao củ dền có thể do có sự hiện diện của các nhóm hydroxyl trong thành phần hóa thực vật.

Hình 1: Quy trình tinh chế 6-O-benzoyl arbutin



nase làm giảm quá trình tăng sắc tố và làm sáng da.

Hoạt tính kháng tyrosinase của các cao chiết từ lá củ đề thấp so với chất chuẩn là β -arbutin, kể cả cao EtOAc, phần đoạn mà chúng tôi đã phân lập được 6-O-benzoyl arbutin. Điều này có thể giải thích là do cao chiết thường chứa hỗn hợp nhiều chất khác nhau, hoạt chất có khả năng ức chế enzyme tyrosinase chiếm tỷ lệ nhỏ nên có thể ảnh hưởng tới hoạt tính của cao chiết.

Vi vậy mục tiêu của giai đoạn sau là xây dựng quy trình chiết thích hợp với dung môi ethanol để chiết được các chất có hoạt tính cao và định hướng ứng dụng vào sản phẩm mỹ phẩm.

3.3. Quy trình chiết và tinh chế hợp chất 6-O-benzoyl arbutin

Sau khi khảo sát các thông số ảnh hưởng tới quy trình chiết, kết quả thu được điều kiện chiết thích hợp như sau: độ cồn 50%, thời gian chiết 30 phút, nhiệt độ chiết 50°C, tỷ lệ $m_{\text{nguyên liệu}}:V_{\text{dung môi}} = 1:5\text{g/mL}$.

Điều kiện chiết thích hợp đã đáp ứng các yêu cầu ban đầu về khối lượng cao chiết và hàm lượng phenol tổng thu được là lớn nhất. Bên cạnh đó, việc sử dụng dung môi chiết là ethanol giúp giảm chi phí dung môi chiết và an toàn với người sử dụng.

Từ điều kiện chiết tối ưu chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình tinh chế hợp chất 6-O-benzoyl arbutin từ cao ethanol.

Dịch chiết nồng độ 80g/L đem tạo tủa với Ca(OH)_2 ở 0°C. Dung dịch sau loại màu đem trao đổi ion

3 lần để loại ion Ca^{2+} , có quy loại dung môi thu cao.

Dựa vào hàm lượng phenol tổng (mg/g) và sự giảm màu sau khi thực hiện phản ứng (ΔE) để chọn điều kiện thích hợp nhất cho quy trình loại màu.

Bảng 3. Khả năng đánh bắt gốc DPPH của cao lá củ đề

	Vitamin C	Cao EtOH	Cao EtOAc	Cao BuOH	Cao nước
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	11.3 \pm 0.0	138.5 \pm 1.8	86.5 \pm 0.5	144.7 \pm 1.5	441.8 \pm 2.8

Bảng 4. Khả năng kháng tyrosinase của cao lá củ đề

	Arbutin	Cao EtOH	Cao EtOAc	Cao BuOH	Cao nước
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	85.0 \pm 1.5	1340 \pm 65.6	1620 \pm 20.0	650 \pm 10.0	2080 \pm 34.6

3.2. Khả năng ức chế tyrosinase

Tyrosinase là enzyme tham gia vào quá trình hình thành nên sắc tố melanin. Việc tích tụ một lượng lớn melanin trong da có thể gây ra nám, tàn nhang, đồi mồi, lão hóa da. Các chất ức chế tyrosi-

Bảng 5. So sánh hoạt tính của cao chiết EtOH sau tối ưu và cao sau loại màu

		Cao chưa loại màu	Cao sau loại màu
Hoạt tính sinh học	Đánh bắt DPPH	39.2 ± 1.8	202.7 ± 4.2
	Ức chế tyrosinase	535.0 ± 52.2	537.5 ± 16.2
Hàm lượng phenol tổng (mg/g)		734.6 ± 13.8	488.5 ± 7.2
Hiệu suất phenol tổng (%)		66.5	

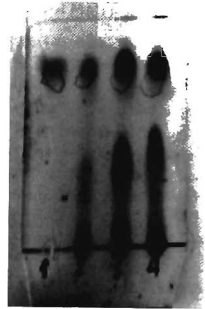
Cao chiết EtOH sau tối ưu có hoạt tính sinh học thay đổi so với cao chiết ban đầu. Cao chiết tối ưu có giá trị IC_{50} trên DPPH là $39.2 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$, cao gấp 2 lần cao phân đoạn EtOAc (xem Bảng 3), chứng tỏ quy trình chiết tối ưu đã chiết ra được phần lớn các chất có tiềm năng kháng oxy hóa. Khả năng kháng oxy hóa của cao sau loại màu giảm nhiều so với cao tối ưu ($IC_{50} = 202.7 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$) do quá trình tạo tủa với $\text{Ca}(\text{OH})_2$ đã loại mất một số chất có khả năng kháng oxy hóa.

Khả năng ức chế enzyme tyrosinase giữa cao tối ưu ($IC_{50} = 535.0 \pm 52.2 \mu\text{g/mL}$) và cao sau loại màu ($IC_{50} = 537.5 \pm 16.2 \mu\text{g/mL}$) gần như không đổi chứng tỏ quá trình loại màu không ảnh hưởng tới các chất có khả năng ức chế enzyme tyrosinase. Hoạt tính ức chế tyrosinase của 2 cao này cao hơn hẳn cao EtOH ban đầu và các cao phân đoạn (Bảng 4).

Từ các kết quả trên có thể thấy quy trình chiết tối ưu đã chiết được các chất có hoạt tính sinh học cao, hiệu quả hơn hẳn cao chiết tổng và các cao phân đoạn, hiệu suất chiết khá cao $H\% = 35.0\%$. Quá trình tinh chế bằng tạo tủa với $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và trao đổi cation đã làm giảm màu dịch chiết một cách hiệu quả, hiệu suất loại màu bằng 46,9%, hàm lượng phenol tổng còn lại bằng 66,5% so với ban đầu.

Kết quả kiểm tra cao sau loại màu bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy ngoài 6-O-benzoyl arbutin vẫn còn hiện diện các hợp chất khác.

Hình 2: Sắc ký lớp mỏng của cao tối ưu và cao sau loại màu (1 - chất chuẩn 6-O-benzoyl arbutin, 2 - cao chiết tối ưu, 3 - cao chiết sau loại màu (giải đoạn 1), 4 - cao chiết sau trao đổi ion (giải đoạn 2))



4. Kết luận

Cao ethyl acetate từ lá có vẻ có hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất với $IC_{50} = 86.5 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$. Trong khi cao n-butanol có hoạt tính ức chế tyrosinase cao nhất với giá trị $IC_{50} = 650 \pm 10 \mu\text{g/mL}$.

Có thể thu 6-O-benzoyl arbutin từ cao củ đề bằng cách chiết với ethanol 50%, tỷ lệ $m_{\text{nguyên liệu}} : V_{\text{dung môi}} = 1:5 \text{ g/mL}$ ở 50°C trong thời gian 30 phút. Hiệu suất chiết đạt 35%.

Loại màu dịch chiết bằng phương pháp tạo tủa với $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Hiệu suất quá trình loại màu đạt 46,88%.

Nguyên liệu củ đề sau khi chiết với ethanol ở các điều kiện thích hợp và qua quy trình loại màu đã thu được cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa, ức chế tyrosinase và hàm lượng hợp chất phenol đáng kể. Cao chiết có màu vàng cam dễ phối vào nền sản phẩm mỹ phẩm.

Kết quả thu được bước đầu góp phần khẳng định hoạt tính sinh học in vitro đáng chú ý của cây củ đề *Breynia vitis-idaea*. Giá trị kháng oxy hóa và khả năng ức chế enzyme tyrosinase giúp định hướng đề nâng cao khả năng ứng dụng trong thực tiễn, đưa vào sản xuất quy mô công nghiệp cho các sản phẩm mỹ phẩm, thực phẩm chức năng từ các hoạt chất của cây củ đề ■

Lời cảm ơn:

Chúng tôi chân thành cảm ơn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh đã tài trợ thực hiện đề tài này (mã số đề tài T-KTHH-2017-96)

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Brand-Williams, W. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food science and Technology*, vol. 28, pp. 25–30.
2. Chen, J. S. (1991): "Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39(8), pp. 1396 - 1401.3. Funyama, M. (1995): "Effects of alpha and beta-arbutin on the activity of tyrosinase from mushroom and mouse melanoma", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 59(1), pp. 143 - 144
4. Hearing, V. J. Jr. (1987): "Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed", *Methods in enzymology*, vol. 142, pp. 154 - 165.
5. Joshi, C. G. (2011): "In vitro antioxidant activities of *Breynia vitis-idaea* extracts", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 3(5), pp 340 - 347.
6. Maeda, K. (1996): "Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 276(2), pp. 765 - 769.
7. Manju Gowda, M.R. (2014): "Anti-cancer activity of aqueous and ethanol extracts of *Breynia vitis-idaea* (Burm. F) C. Fisher leaves by using HEPG2 cell line", *World Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals Sciences*, vol. 4(2), pp. 820 - 840
8. Masamoto, Y. (2003): "Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculentin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L.", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 67(3), pp. 631 - 634.
9. Meng, D. H. (2010). "Two new glycosides from *Breynia vitis-idaea*", *Journal of Asian natural products research*, vol. 12(6), pp 535 - 541.
10. Morikawa, H. (2004). "Terpenic and phenolic glycosides from leaves of *Breynia officinalis* HEMSL", *Chemical and pharmaceutical bulletin*, vol. 52(9), pp. 1086 - 1090.
11. Nagar, J. C. (2016): "Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of *Breynia vitis-idaea* leaf extracts in streptozotocin induced diabetic rats", *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, vol. 3(2), pp. 194 - 199.
12. Nguyen, T. M. (2017): "Chemical constituents of *Breynia vitis-idaea* (Burm. f.) C. E. C. Fischer," *AIP Conference Proceedings*, vol. 1878, p. 020041.
13. Parvez, S. (2006): "Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents", *Phytotherapy. Research*, vol. 20(11), pp 921 - 934.
14. Pop, C. (2009): "Natural resources containing arbutin: determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch acclimated in Romania", *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 37(1), pp. 129 - 132.
15. Seo, S. Y. (2003). "Mushroom Tyrosinase. recent prospects". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51(10), pp. 2937 - 2853.
16. Singleton, V.L. (1999): "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", *Methods in enzymology*, vol. 299, pp. 152 - 178.

Ngày nhận bài: 2/3/2019

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 12/3/2019

Ngày chấp nhận đăng bài: 22/3/2019

Thông tin tác giả:

1. LÊ XUÂN TIẾN
2. LÊ HẢI HÀ LINH
3. NGUYỄN KIM MINH TÂM

Khoa Kỹ thuật Hóa học

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

EXTRACTION PROCESS AND IN VITRO BIOACTIVITIES OF EXTRACTS FROM BREYNIA VITIS-IDAEA (BURM.F.) C.E.C. FISCHER LEAVES

● LE XUAN TIEN

● LE HAI HA LINH

● NGUYEN KIM MINH TAM

Faculty of Chemical Engineering

Ho Chi Minh City University of Technology

ABSTRACT:

This study is to analyze some biological activities of In Vitro and the process of extracting the active substance from *Breynia vitis-idaea* leaves (Burm.f.) C.E.C. Fischer. In vitro antioxidant activities of the extracts were determined by the free radical scavenging capacity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) meanwhile anti-hyperpigment activities were tested through tyrosinase inhibitory assay. The results showed that ethyl acetate extracts exhibited the highest antioxidant activity [IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 86.5 ± 0.5 compared to IC_{50} = 11.3 ± 0.0 of vitamin C] and n-butanol extracts had strong tyrosinase inhibitory potential [IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 650 ± 10 compared to IC_{50} = 85 ± 1.5 of arbutin]. Processes of extraction using non-toxic solvent (ethanol) have been established: grinded leaves (7 g) were extracted twice with 70 mL of ethanol – water mixture (1:1) for 30 mins at 50°C. Decolourisation also has been done using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ precipitation method at 0°C. The efficiency of precipitation assay was 46.88%.

Keywords: *Breynia vitis-idaea*, DPPH, tyrosinase, extraction.