

Định tính thành phần hóa học và xác định hoạt tính ức chế hắc tố của cây Mật gấu bắc (*Mahonia nepalensis*)

Nguyễn Lương Hiếu Hòa¹, Lê Quỳnh Loan², Lê Văn Minh³, Nguyễn Hoàng Dũng^{2,*}

¹ Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. Hồ Chí Minh

*nhdung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Cây mật gấu (*Mahonia nepalensis*) thường phân bố nhiều ở các tỉnh miền núi ở nước ta như Lai Châu, Lào Cai, Hà Giang, Cao Bằng, Bắc Cạn và Lâm Đồng từ độ cao 1.700 -1.900m. Vỏ và thân cây mật gấu có tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và trị các bệnh da liễu. Tuy nhiên, khả năng ức chế việc tổng hợp hắc tố vẫn chưa được công bố. Trong nỗ lực tìm kiếm các thảo mộc tự nhiên có tác dụng làm trắng da, chúng tôi tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế tổng hợp hắc tố của cây mật gấu trên dòng tế bào B16F10 melanoma. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol của cây mật gấu không gây độc tế bào B16F10 melanoma ở nồng độ 200µg/ml. Ở nồng độ 100µg/ml, nó có thể ức chế 37,15% lượng hắc tố tạo thành trong tế bào B16F10 melanoma. Cao chiết cây mật gấu cũng cho thấy khả năng bắt gốc tự do tốt với IC₅₀ = 346µg/ml. Các kết quả trên cho thấy, cây mật gấu có tiềm năng ứng dụng như một chất làm trắng da trong mỹ phẩm. Các đơn chất có hoạt tính đang trong quá trình phân lập.

Nhận 21.09.2018

Được duyệt 30.11.2018

Công bố 25.12.2018

Từ khóa

melanin, *Mahonia nepalensis*, tyrosinase, trắng da.

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Melanin là một hợp chất sinh học cao phân tử có vai trò quan trọng trong việc tạo nên sắc tố ở da người cùng với các sắc tố khác như hemoglobin, carotene [1,2]. Melanin có vai trò quan trọng cho việc qui định màu sắc của da, tóc, mắt ở mỗi người, ngoài ra chúng có tác dụng bảo vệ cơ thể khỏi những tác động xấu của môi trường như tia UV, gốc tự do... Ở người, melanin được tìm thấy chủ yếu ở da, tóc, các mô sắc tố nằm bên dưới tròng đen của mắt hoặc trong chất xám của não. Ở da, melanin được sản xuất bởi tế bào melanocytes nằm trong lớp nền của biểu mô [3]. Trong melanocytes, melanin được tổng hợp trong một bào quan đặc biệt là melanosome. Tyrosinase là enzyme chính trong quá trình tổng hợp hắc tố. Tyrosinase xúc tác phản ứng hydroxy hóa tyrosine thành L-DOPA và oxy hóa L-DOA thành DOPA quinone [4]. Một số enzyme khác như TRP-1, TRP-2 cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp [5]. Tuy đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể khỏi tác động của tia cực tím nhưng việc biểu hiện quá mức hắc tố dẫn đến một số bệnh về da như nám, tàn nhang, viêm da. Các rối loạn hormone trong cơ thể cũng có thể dẫn

tới hiện tượng đen da. Do tác động không mong muốn của các bệnh này nên người bệnh mang cảm giác mặc cảm, giảm hiệu quả trong công việc và các hoạt động xã hội. Do đó, nhiều loại sản phẩm làm trắng da đã và đang được mua bán trên thị trường. Tuy nhiên, một số sản phẩm có nguồn gốc không rõ ràng, có tác dụng phụ hoặc hiệu quả không cao. Do đó, các nghiên cứu để tìm ra các hợp chất mới có tiềm năng ứng dụng trong hóa - mỹ phẩm là một hướng nghiên cứu đang nhận được nhiều sự quan tâm.

Cây Mật gấu bắc phân bố một số quốc gia Châu Á như Bhutan, Ấn Độ và Nepal nhưng nhiều nhất ở miền Nam Trung Quốc (An Huy, Quảng Đông, Quảng Tây, Hồ Nam, Hồ Bắc, Giang Tô, Giang Tây) và một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam có khí hậu mát mẻ như Hà Giang, Lào Cai, Sơn La, Hòa Bình và Điện Biên [6]. Cây mật gấu chứa chủ yếu là các alkaloid có nhân isoquinolin, bao gồm 2 nhóm chính là protoberberin và bisbenzylisoquinoline. Trong đó, các alkaloid có khung protoberberin là thành phần chính. Theo y học cổ truyền, cây mật gấu dùng để chữa các bệnh như ho, sốt con, khạc máu, lưng gối yếu mỏi, chóng mặt, ù tai, mất ngủ. Theo y học hiện đại, các alkaloid



có trong cây Mật gấu bắc có tác dụng hạ huyết áp, giúp an thần và tác dụng ức chế nhiều loại vi khuẩn như *Streptococcus hemolyticus*, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus virideus*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus proteus* [8]. Hiện nay, dịch chiết cồn của cây mật gấu đang được sử dụng để làm sáng da. Tuy nhiên, cơ sở khoa học giải thích hiệu quả ức chế tổng hợp sắc tố của cây mật gấu vẫn chưa được công bố. Vì vậy, thành phần hóa học và hoạt tính ức chế sắc tố của cây mật gấu sẽ được xác định trong nghiên cứu này.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu và hóa chất

Mushroom tyrosinase, L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), Arbutin, DMSO (dimethyl sulfoxide) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) được cung cấp bởi Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A). Môi trường DMEM, huyết thanh bê (fetal calf serum- FBS), trypsin EDTA, Phosphate buffered saline (PBS), Penicillin/streptomycin được cung cấp bởi Invitrogen Corp. (CA, U.S.A).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp định tính thành phần hóa học

Phương pháp định tính thành phần hóa học được thực hiện dựa trên phương pháp của Cilley và cộng sự.

2.2.2 Phương pháp nuôi cấy tế bào

Tế bào B16F10 melanoma được cung cấp bởi ATCC. Tế bào B16F10 được nuôi trên môi trường DMEM bổ sung 10% (v/v) huyết thanh bê (FBS) và 1% (v/v) kháng sinh penicillin/streptomycin ở 37°C, 5% CO₂, hơi nước bão hòa. Tế bào được cấy chuyển sau mỗi 3 ngày và sử dụng cho đến lần cấy chuyển thứ 30.

2.2.3 Phương pháp tách chiết

Mẫu thân cây Mật gấu bắc khô được nghiền mịn thành dạng bột. Bột được chiết ba lần bằng dung môi Methanol (99,5%) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết methanol sau đó được lọc qua giấy lọc, cô cạn bằng máy cô chân không ở 35°C để tạo thành cao methanol. Sau đó, cao methanol được phân đoạn bằng các dung môi hữu cơ để tạo thành các phân đoạn Hexane, Chloroform, Ethyl acetate.

2.2.4 Phương pháp xác định hàm lượng melanin

Tế bào B16 được nuôi cấy ở mật độ 6x10⁴ tế bào trên đĩa 6 giếng (6-well plate). Sau 24 giờ nuôi cấy, tế bào được ủ với các mẫu cần kiểm tra trong vòng 48 giờ. Sau 48 giờ nuôi cấy, tế bào được thu nhận và được hòa tan trong 200µl DMSO chứa 10% NaOH. Sau đó, mẫu được đem đun ở 80°C trong vòng 1 giờ. Hàm lượng melanin được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 405nm. Arbutin (200µg/ml) được sử dụng như là đối chứng dương [16].

2.2.5 Phương pháp xác định độc tính (MTT assay)

Để xác định độc tính của cây Mật gấu bắc trên tế bào B16F10 melanoma, thử nghiệm dựa trên sự đổi màu của MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) được sử dụng. Tế bào B16 được nuôi trên đĩa 96 giếng (96-well plate) ở mật độ tế bào 2,5x10³. Sau 24 giờ, tế bào được ủ với mẫu cần kiểm tra ở các nồng độ khác nhau và được nuôi cấy tiếp trong 48 giờ. Sau đó 100µl dung dịch MTT nồng độ 5mg/ml được bổ sung vào các giếng. Sau 4 giờ ủ ở 37°C, môi trường chứa dung dịch MTT được hút ra và 100µl DMSO được cho vào để hòa tan các formazan được tạo ra. Sau đó mẫu được đem đi đo quang phổ ở bước sóng 540nm [16].

2.2.6 Phương pháp xác định tính chống oxy hóa (DPPH assay)

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH. Mẫu được hòa trong dung dịch PBS ở các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 100µl mẫu, 100µl dung dịch DPPH trong đĩa 96 giếng được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó mẫu được đem đi đo quang phổ ở bước sóng 517nm. Khả năng chống oxy hóa được xác định theo công thức % scavenging activity = [Acontrol-Asample]/Acontrol*100.

2.2.7 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị số liệu được biểu thị ở giá trị trung bình ± SD (standard derivation). Sự khác biệt giữa các mẫu được kiểm tra bằng t-test với giá trị P<0,05 được xem là khác biệt có ý nghĩa.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Định tính thành phần hóa học của cây Mật gấu bắc

Sự hiện diện các thành phần hóa học được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả cho thấy trong cây Mật gấu thu nhận có các thành phần như carbohydrate, alkaloid, flavonoid và tinh dầu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Trịnh Đình Khả và cộng sự.

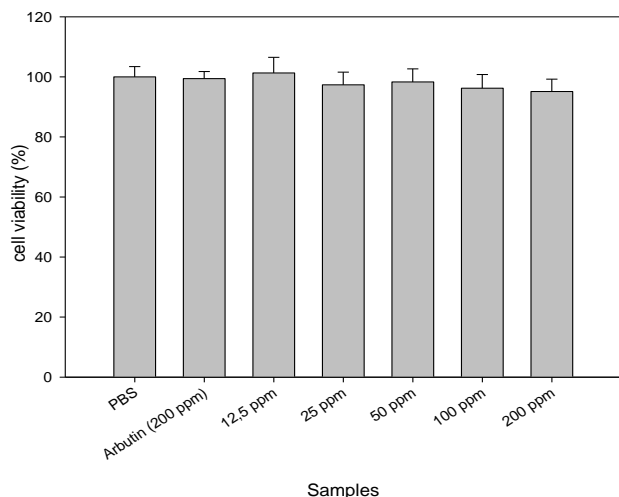
Bảng 1 Thành phần hóa học trong cây mật gấu

Hợp chất	Thuốc thử	Kết quả	
Carbohydrate	Fehling	Kết tủa màu nâu đỏ	(+)
	Benedict	Mỗi loại carbohydrate sẽ cho một màu đặc trưng	(+)
Alkaloid	Mayer	Kết tủa màu đục	(+)
	Wagner	Kết tủa màu nâu đỏ	(+)
	Bouchardat	Kết tủa màu nâu	(+)
Flavonoid	Alkalie	Xuất hiện màu vàng khi cho NaOH, mất màu khi cho HCl	(+)
	FeCl ₃ 5%	Kết tủa màu nâu	(+)

Tannin test	Natri acetate, FeCl ₃ 5%	Dung dịch có màu xanh đen	(-)
Chất béo	Gelatin 1%	Kết tủa trắng Hình thành bọt ổn định	(-)
Foam test	Không	Hình thành bọt ổn định	(-)
Tinh dầu	Không	Có mùi thơm	(+)

3.2 Khảo sát hoạt tính gây độc của cao chiết mật gấu lên tế bào B16F10 melanoma

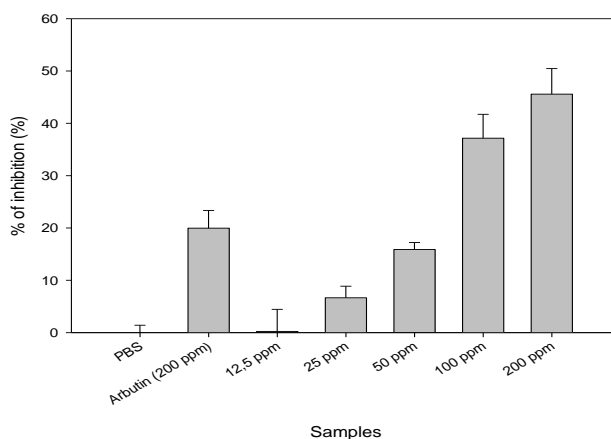
Để kiểm tra xem cây mật gấu có gây chết tế bào B16F10 melanoma hay không, cao chiết cây mật gấu được thử với các nồng độ khác nhau từ 12,5 – 200µg/ml trên dòng tế bào này và độc tính tế bào được đánh giá qua thử nghiệm MTT. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol của cây mật gấu không gây chết tế bào cho tới nồng độ 200µg/ml (Hình 1). Do đó, các thử nghiệm tiếp theo được tiến hành cho tới nồng độ này.



Hình 1 Ảnh hưởng cao chiết cây mật gấu lên độc tính tế bào B16F10 melanoma

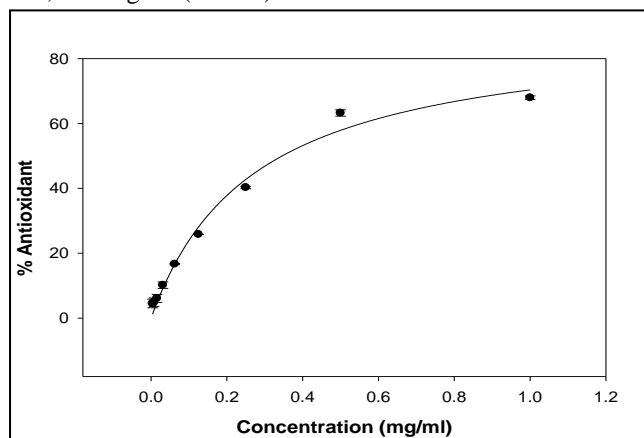
3.3 Khảo sát ảnh hưởng của cao chiết mật gấu lên khả năng ức chế melanin

Để khảo sát ảnh hưởng của cao chiết mật gấu lên quá trình tổng hợp hắc tố, cao chiết ở các nồng độ khác nhau được xử lý với tế bào B16F10 melanoma trong vòng 3 ngày. Arbutin (200µg/ml) được sử dụng làm đối chứng dương. Arbutin thường được sử dụng trong các sản phẩm thương mại làm trắng da. Kết quả cho thấy, cao chiết cây mật gấu ức chế hắc tố theo nồng độ tăng dần từ 12,5µg/ml đến 200µg/ml. Ở nồng độ 100µg/ml, cao chiết mật gấu có thể ức chế 37,15% lượng melanin được tổng hợp bởi tế bào B16F10. So sánh với arbutin, cao chiết mật gấu cho hiệu quả cao hơn đáng kể. Ở nồng độ 200µg/ml, cao chiết mật gấu cho thấy hiệu quả hơn 2,25 lần so với arbutin (Hình 2).



Hình 2 Ảnh hưởng của cao chiết cây mật gấu lên quá trình tổng hợp hắc tố trong tế bào B16F10 melanoma

3.4 Khảo sát khả năng bắt gốc tự do của cao chiết mật gấu
Việc tiếp xúc với tia cực tím (UV) có thể cảm ứng quá trình tạo các gốc tự do. Các gốc tự do này gây ra tác động tiêu cực như phá hủy DNA, oxy hóa lipid màng, làm tăng quá trình tổng hợp hắc tố. Một số nghiên cứu cho thấy, các chất có khả năng ức chế hay bắt các gốc tự do này, như các chất chống oxy hóa, có thể làm giảm quá trình tăng tổng hợp hắc tố. Để kiểm tra xem cao chiết hắc tố có khả năng bắt gốc tự do hay không, thử nghiệm DPPH được thực hiện. Kết quả cho thấy, cao chiết mật gấu có khả năng bắt gốc tự do tương đối tốt. Nồng độ bắt gốc tự do 50% được xác định là 0,346 mg/ml (Hình 3).



Hình 3 Ảnh hưởng cao chiết cây mật gấu lên khả năng bắt gốc tự do

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, cao chiết mật gấu cho thấy khả năng ức chế tốt quá trình tổng hợp hắc tố ở dòng tế bào B16F10 melanoma. Cao chiết mật gấu cũng không gây độc tế bào và có hoạt tính bắt gốc tự do. Các kết quả trên cho thấy tiềm năng của cây mật gấu trong việc phát triển các sản phẩm có khả năng làm trắng da. Các đơn chất có hoạt tính của cây mật gấu đang trong quá trình cô lập.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2018.01.08

Tài liệu tham khảo

1. Hearing V.J, Determination of melanin synthetic pathway, *Journal of Invest Dermatol*, 131 (2011) 8–11.
2. Kanlayavattanakul M and Lourith N, Skin hyperpigmentation treatment using herbs: a review of clinical evidence, *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 20(2) (2018) 123–131.
3. Cayce K.A., McMichael A.J. and Feldman S.R., Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions. *Dermatology nursing*, 401(2004) 6 -13.
4. Wang K.H., Lin R.D., Huang Y.H., Chang H.C., Huang C.Y., Lee M.H., Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3) (2006) 353-359.
5. Pillaiyar T., Manickam M., Namasivayam V., Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1) (2017) 403-425.
6. Nguyen Thi Mai, Tran Anh Tuan, Hoang Thanh Huong, Chau Van Minh, Ninh Khac Ban, and Phan Van Kiem, Secobisbenzylisoquinoline alkaloid from *mahonia Nepalensis* DC., *Tạp chí khoa học và công nghệ*, 46(5) (2008) 63-68.
7. He J.H. and Mu Q., The medicinal uses of the genus mahonia in traditional Chinese Medicine: an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review, *Journal of Ethnopharmacology*, 175 (2015) 668–683.
8. Trinh Dinh Kha, Ha Thi Thanh Hoan, Nguyen Thi Thu Hien, Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế tụ cầu vàng (*staphylococcus aureus*) của cao chiết ethanol từ cây hoàng liên ô rô (*Mahonia nepalensis* DC.), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 14(5) (2016) 779-784.
9. Nguyen Hoang Dung, Nguyen D.T.M. and Kim E.K. ,Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) release from laboratory equipments. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25 (2008) 1136-1139.

The chemical composition and melanin inhibitor activities of *Mahonia nepalensis*

Nguyen Luong Hieu Hoa¹, Le Quynh Loan², Le Van Minh³, Nguyen Hoang Dung^{2,*}

¹ Nguyen Tat Thanh University

² Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

³ Research Center of Ginseng and Materia Medica

* nhdung@ntt.edu.vn

Abstract

Mahonia nepalensis DC.1821 (Hoang Lien O Ro) is widely distributed in the high mountainous areas at altitudes 1,700 – 1,900m of Vietnam as Lai Chau, Lao Cai, Ha Giang, Cao Bang, Bac Can and Lam Dong provinces. The stem bark and wood of *Mahonia nepalensis* were considered to have anti-inflammatory, anti-bacterial and antifungal activities and they are used particularly for the treatment of skin diseases. However, the effect of *Mahonia nepalensis* on melanin inhibition was not well-documented. In continuing to search new materials for skin whitening agents from natural resources, we investigated the effect of *Mahonia nepalensis* DC. on the melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. The results indicated the methanol extract of this plant did not show any significant toxicity to B16F10 melanoma cells at even high concentration (up to 200µg/ml) and could significantly inhibit the melanin content. At the concentration of 100µg/ml, it could inhibit 37,15% of melanin formation in the B16F10 melanoma cells (compared with Arbutin, the well-known commercial melanin inhibitor, could inhibit 20,25% of melanin content at the concentration of 200µg/ml). This plant also showed free radical scavenging activity with $IC_{50} = 346\mu\text{g/ml}$. In conclusion, the methanol extract of *Mahonia nepalensis* could be used as an effective whitening ingredient in cosmetic products. The isolation of single active compound is on process.

Keywords Inhibition, *Mahonia nepalensis*, melanin, tyrosinase