

Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxi hóa, ức chế tyrosinase của cao ethanol chiết xuất từ cây Huỳnh Anh (*Allamanda neriifolia*)

•Trần Phạm Tuệ Hưng

•Nguyễn Thị Mỹ Hạnh

•Quách Ngô Diễm Phương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 29 tháng 07 năm 2014, nhận đăng ngày 16 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Cao ethanol các bộ phận rễ, thân trục, thân leo, lá của cây Huỳnh anh (*Allamanda neriifolia*) được khảo sát khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hóa, ức chế tyrosinase. Trong những bộ phận này, cao ethanol từ thân leo thể hiện các hoạt tính cao nhất so

với các đối tượng còn lại. Định tính sự có mặt các hợp chất thứ cấp trong cao ethanol từ thân leo cho thấy sự hiện diện của alkaloid, steroid, triterpenoid, phenol, tannin và flavonoid. Phân tích dạng flavonoid cho thấy mẫu có thể có flavan hoặc chalcone.

Từ khóa: Ức chế tyrosinase, Huỳnh Anh (*Allamanda neriifolia*), kháng oxi hóa.

MỞ ĐẦU

Nám da, sạm đen là các dấu hiệu bệnh lý do sự biểu hiện vượt mức melanin ở da. Để khắc phục các triệu chứng này, người ta thường sử dụng các hóa chất có khả năng ức chế tyrosinase—enzyme tham gia sinh tổng hợp melanin. Tuy nhiên, việc sử dụng các hóa chất này có thể gây ra tác dụng phụ cho người dùng; trong số đó, một số loại đã bị cấm sử dụng ở nhiều nước. Thay vào đó, những hoạt chất chiết xuất từ dược liệu có khả năng ức chế tyrosinase được sử dụng bởi hiệu quả làm trắng da và tính an toàn [1].

Cây Huỳnh Anh có nguồn gốc Trung và Nam Mỹ. Bên cạnh giá trị làm cảnh, nhiều loài trong chi như *A.carthartica*, *A.blanchetti* ... đã được chứng minh có nhiều đặc tính dược học khác cũng như ức chế tyrosinase. Nghiên cứu của Omonhinmin A và cộng sự năm 2011 đã chứng minh khả năng của *A.cathartina* trong chữa trị sốt rét *in vivo* bằng cơ chế kích thích hoạt động

của các hệ thống chống oxy hóa của cơ thể. Dịch chiết rễ, lá và hoa đã được chứng minh có khả năng kháng sự hình thành khối u *in vitro* trên tế bào K562 leukemia... [3-5,7,8].

Melanin là những hợp chất màu, dạng polyphenol, tồn tại ở da, lông, tóc, mắt người,... Nó giữ vai trò quan trọng trong cân bằng thể oxy hóa của da bởi khả năng bắt gốc tự do. Melanin được sinh tổng hợp ở melanocyte, bắt đầu từ cơ chất L-tyrosin với sự tham gia của enzyme tyrosinase. Do vậy, ức chế enzyme tyrosinase, làm giảm lượng melanin tạo thành [6].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Cây Huỳnh Anh được thu hái tại Quận Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh và được định danh tại Bộ môn Sinh thái và Sinh học tiến hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-

HCM. Bốn bộ phận của cây: rễ, thân trực, thân leo và lá được thu hái, sấy khô, xay nhỏ.

Phương pháp

Điều chế cao ethanol

Cao ethanol của các bộ phận được điều chế bằng phương pháp ngâm trong 24 giờ. Sau khi ngâm và chiết 3 lần, các mẫu được cô quay thu cao thô.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng đo đường kính vòng vô khuẩn

Các chủng khuẩn sử dụng: *Staphylococcus aureus K*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp* được hoạt hóa và trải trên môi trường LB.

Cao ethanol 4 bộ phận của cây được pha loãng trong ethanol tuyệt đối và đặt lên đĩa giấy 5mm với nồng độ 500µg/đĩa. Kanamycin nồng độ 30µg/đĩa làm chứng dương, ethanol 5µl/đĩa làm chứng âm.

Khảo sát năng lực khử theo Yen và Duh (1993)

Cao ethanol 4 bộ phận của cây và vitamin E (chứng dương) được pha loãng trong ethanol tuyệt đối với nồng độ 500µg/ml. Ethanol tuyệt đối là chứng âm. Hút lần lượt 1 ml các dung dịch trên vào ống nghiệm riêng biệt, bổ sung 2,5ml dung dịch đệm $\text{Na}_2(\text{PO}_4)_3$ 0,2M - pH 6,6, lắc đều, thêm 2,5ml $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 1% và ủ ở 50°C, 20 phút. Thêm 2,5ml TCA 10% và ly tâm 7000 vòng trong 2 phút. Thu 1 ml dịch nổi, thêm 2ml nước cất, 0,5ml dung dịch FeCl_3 1%. Sản phẩm thu được đo độ hấp thụ ở 700nm.

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH

Cao ethanol 4 bộ phận của cây được pha loãng trong ethanol tuyệt đối thành dãy nồng độ khác nhau. Vitamin E là chứng dương, ethanol tuyệt đối là chứng âm. Hút lần lượt 0,5ml các dung dịch trên vào từng ống nghiệm, thêm 3ml ethanol tuyệt đối, 0,5ml dung dịch DPPH 0,6mM được pha trong ethanol tuyệt đối. Lắc đều hỗn hợp, ủ tối 30 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp

thụ ở bước sóng 517nm. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được xác định bằng công thức:

$$\% \text{IC} = \frac{[(A \text{ chung am} - A \text{ blank}) - (A \text{ thu nghiệm} - A \text{ blank})] \times 100}{(A \text{ chung am} - A \text{ blank})} \quad (1)$$

Lựa chọn dung môi pha cao và khảo sát khả năng ức chế tyrosinase

70µl dung dịch cao ethanol thân leo pha loãng trong ethanol tuyệt đối, DMSO 1%, DMSO 100% thành dãy nồng độ khác nhau được nạp lên đĩa 96 giếng. Mẫu chứng âm không chứa chất thử nghiệm. Thêm 30µl dung dịch tyrosinase nồng độ 333U/ml và ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút. Thêm 110µl L-tyrosine 2mM và tiếp tục ủ trong 30 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm. Kojic acid được dùng làm chứng dương. Các mẫu đi kèm với mẫu blank không chứa tyrosinase. Phần trăm ức chế tyrosinase được xác định bằng công thức (1).

Tiến hành so sánh khả năng ức chế tyrosinase của cao ethanol 4 bộ phận của cây ở nồng độ 550µg/ml bằng cách lặp lại thí nghiệm như trên.

Định tính các hợp chất thứ cấp trên mẫu cao ethanol thân leo

Cao thân leo pha loãng trong ethanol tuyệt đối nồng độ 1mg/ml và định tính sự hiện diện các hợp chất thứ cấp bằng thuốc thử khác nhau: alkaloid (Wagner), triterpenoid - steroid (Lieberman Burchard, Salkowski), saponin (HCl 0,1N, NaOH 0,1N), phenol (FeCl_3 5%), tannin (gelatin mặn), flavonoid (chì acetat, H_2SO_4 đậm đặc, NaOH 1%, Shinoda). Các mẫu thử đi kèm với mẫu chứng âm chỉ có dung môi và thuốc thử [1].

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3 Service Park 4. Sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức P (p-value) < 0,05. Các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Điều chế cao ethanol

Cao ethanol các bộ phận rễ, thân trực, thân leo, lá của cây Huỳnh anh có hiệu suất chiết cao lần lượt là 10,23; 4,63; 4,47; 34,12 (%) tính trên trọng lượng khô. So với các bộ phận còn lại, lá có chứa nhiều hợp chất hòa tan trong ethanol nhất.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các cao chiết

Ở Bảng 1 kết quả kháng khuẩn của kanamycin chứng minh thí nghiệm hoạt động tốt và mẫu chứng âm ethanol chứng minh hoạt tính kháng khuẩn của các loại cao hoàn toàn do các hợp chất có trong cây.

Ở nồng độ 500µg/đĩa, cao thân leo thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *S.aureus* –

vi khuẩn gây các bệnh viêm da, có thể trở thành nhân tố góp phần quan trọng trong thành phần mỹ phẩm dưỡng da. Cao thân trực có hoạt tính kháng mạnh đối với *Samonella* spp, *S.aureus*. Cao rễ kháng mạnh với *E.coli*, *Samonella* spp, *S.aureus*. So với nghiên cứu của Mohammad Rashedul Islam (2010), các phân đoạn khác nhau từ cao methanol lá của 1 loài dây huỳnh khác (*Allamanda carthartica*) đều thể hiện khả năng kháng khuẩn thấp cho 2 chủng *S.aureus* và *E.coli*. Trong nghiên cứu của Swjanja Pulipati và cộng sự (2012) đối với hoa của cây *Allamanda carthartica*, khi ly trích bằng ethanol, với nồng độ 500µg/đĩa cho hoạt tính kháng khuẩn trung bình với *S.aureus* và *E.coli* [10].

Bảng 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn từ cao ethanol 4 bộ phận của cây (đơn vị tính: mm)

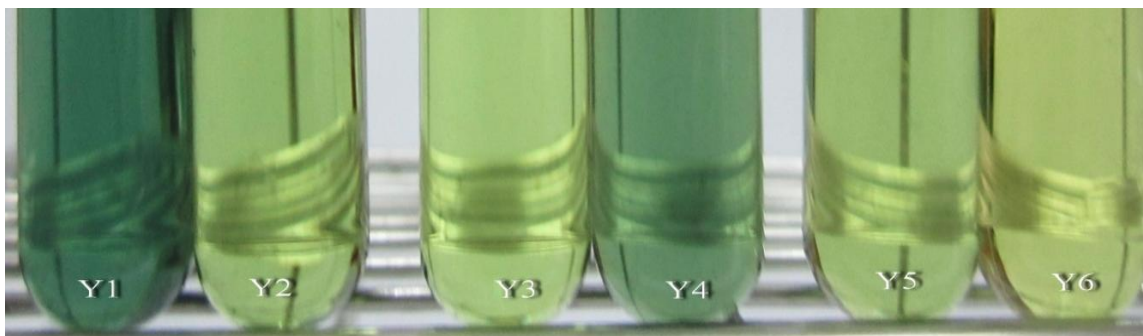
Chủng vi khuẩn khảo sát	Lá	Thân leo	Thân trực	Rễ	Kanamycin	Ethanol
<i>S. aureus K</i>	6,00±1,00 ^c	7,67±1,15 ^c	7,33±0,58 ^c	12,33±2,08 ^b	19,67±1,53 ^a	6,67±0,58 ^c
<i>S. aureus</i>	13,67±1,53 ^b	18,33±2,08^a	17,67±2,51^a	16,33±1,53^{ab}	17,33±3,05 ^a	6,67±1,15 ^c
<i>Shigella flexneri</i>	5,67±0,58 ^c	7,33±0,58 ^c	5,67±0,58 ^c	12,00±1,00 ^b	18,67±2,89 ^a	6,33±0,58 ^c
<i>B. subtilis</i>	7,00±1,00 ^b	6,00±1,00 ^b	5,67±0,58 ^b	7,33±1,15 ^b	21,00±1,00 ^a	6,67±1,53 ^b
<i>E. coli</i>	13,33±2,08 ^b	14,33±0,58 ^b	14,67±0,58 ^b	18,67±1,15^a	19,67±0,58 ^a	6,67±1,53 ^c
<i>Pseudomonas</i> spp.	8,33±2,08 ^c	8,67±1,53 ^c	13,67±4,51 ^b	14,67±1,53 ^b	21,67±1,53 ^a	6,67±0,58 ^c
<i>Samonella</i> spp.	11,33±2,08 ^c	10,67±2,08 ^c	19,67±0,58^{ab}	16,33±3,21^b	21,33±1,53 ^a	6,33±0,58 ^d

(a, b, c là thứ tự phân hạng)

Khảo sát năng lực khử của các cao chiết

Bảng 2. Kết quả khảo sát năng lực khử của các cao chiết

	Vitamin E	Rễ	Thân trực	Thân leo	Lá	Ethanol
OD ₇₀₀	0,72±0,02 ^a	0,23±0,02 ^c	0,17±0,00 ^d	0,52±0,05 ^b	0,19±0,00 ^{cd}	0,10±0,02 ^e

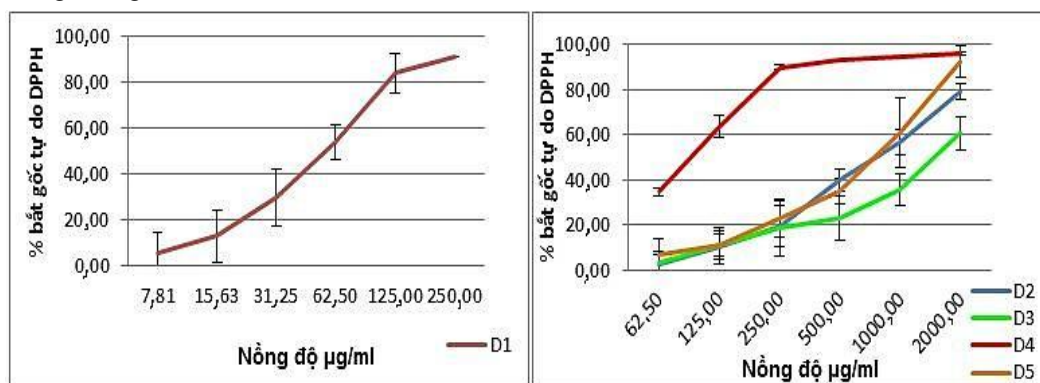


Hình 1. Kết quả khảo sát năng lực khử của các cao chiết (Y1-vitamin E, Y2-rễ, Y3-thân trực, Y4-thân leo, Y5-lá, Y6 chứng âm)

Dựa vào Bảng 2, cả 4 loại cao ethanol của các bộ phận rễ, thân trực, thân leo, lá ở nồng độ 500µg/ml đều thể hiện năng lực khử sắt. Tất cả các mẫu thí nghiệm đều có giá trị độ hấp thu xếp hạng cao hơn mẫu chứng âm ethanol. Cao thân leo có năng lực khử mạnh nhất, gần bằng ¾ mẫu chứng dương vitamin E.

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH của các cao chiết

Từ đường cong thể hiện tương quan tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và giá trị % bắt gốc tự do DPPH (Hình2) nội suy được giá trị IC₅₀ ức chế DPPH của các mẫu cao thí nghiệm.



Hình 2. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của vitamin E và các cao ethanol từ 4 bộ phận cây Huỳnh anh ở các nồng độ khác nhau (D1-vitamin E, D2-rễ, D3-thân trực, D4-thân leo, D5-lá)

Bảng 3. Giá trị IC₅₀ ức chế DPPH của các cao chiết từ 4 bộ phận cây Huỳnh Anh

	Vitamin E	Rễ	Thân trực	Thân leo	Lá
IC ₅₀	62,04±17,97 ^c	713,44±188,89 ^b	1397,24± 263,80 ^a	100,65±2,83 ^c	936,86±33,69 ^b

Dựa vào Bảng 3, cao thân leo có giá trị IC₅₀ thấp nhất so với 3 bộ phận còn lại, đạt 100,65µg/ml. So với giá trị IC₅₀ của vitamin E là 62,04µg/ml, cao thân leo thể hiện khả năng bắt gốc tự do rất mạnh. Kết quả này cũng tương đương với nghiên cứu được trình bày trong báo cáo của Amjad Hameed và cộng sự năm 2014 của loài *A. cathartica* [2].

Lựa chọn dung môi pha cao và khảo sát khả năng ức chế tyrosinase

Sử dụng ethanol tuyệt đối và DMSO100%, giá trị % ức chế tyrosinase của mẫu không tương quan nồng độ chất thử nghiệm. Ngược lại, khi sử dụng DMSO 1% pha loãng cao, giá trị %

ức chế tăng theo nồng độ chất thử nghiệm (Bảng 4).

Bảng 4. Giá trị ức chế tyrosinase của các cao thân leo pha trong các dung môi khác nhau

Nồng độ kojic acid	% Ức chế của kojic acid	Nồng độ mẫu TN ($\mu\text{g/ml}$)	% Ức chế mẫu TN pha trong ethanol 100%	% Ức chế mẫu TN pha trong DMSO 100%	% Ức chế Mẫu TN pha trong DMSO 1%
500	97,08	2000	-344,53	-1,46	87,07
250	96,35	1000	-102,19	18,25	74,14
125	96,35	500	-32,12	29,93	50,13
62,50	86,13	250	18,25	18,25	35,09
31,25	75,18	125	57,66	9,49	27,70
15,63	54,74	62,50	64,23	5,84	19,79
7,81	4,38	31,25	65,69	13,87	17,68
3,91	1,46	15,63	62,77	21,90	14,78

Nguyên nhân có thể do DMSO và ethanol có khả năng làm mất tính ổn định cấu trúc protein, ảnh hưởng đến hoạt tính của tyrosinase trong thí nghiệm. Theo Tjernberg và cộng sự (2009), nồng độ DMSO > 5% có khả năng ảnh hưởng đến enzyme và sụnhiễm các tạp chất trong DMSO cũng như ethanol cũng dẫn tới hệ quả tương tự.

Nội suy từ tương quan tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và giá trị % ức chế tyrosinase (Bảng 4) có được giá trị IC_{50} ức chế tyrosinase của mẫu cao thân leo (hòa tan trong DMSO 1%) là $537,63\mu\text{g/ml}$ và mẫu chứng dương kojic acid đạt $9,86\mu\text{g/ml}$.

Ở nồng độ $550\mu\text{g/ml}$, gần bằng giá trị IC_{50} của cao thân leo, các mẫu thân trực, rễ, lá đều có giá trị % ức chế thấp hơn mẫu cao thân leo. So với các nghiên cứu khác, trong cùng 1 chi *Allamanda* thì mẫu thân leo được thử nghiệm (*Allamanda neriifolia*) có hoạt tính thấp hơn *Allamanda carthartica* nhưng cao hơn *Allamanda blanchetti*. Cao thân leo cũng thể hiện hoạt tính ức chế tyrosinase cao hơn củ nghệ *Curcuma longa* với IC_{50} $785,10\mu\text{g/ml}$ được dân gian sử dụng làm mờ sẹo, trị thâm đen[4, 5, 9].

Bảng 5.Phần trăm ức chế tyrosinase của cao chiết từ 4 bộ phận cây Huỳnh Anh ở nồng độ $550\mu\text{g/ml}$

	Rễ	Thân trực	Thân leo	Lá
% Ức chế	$27,67 \pm 0,44^{bc}$	$40,60 \pm 1,85^{ab}$	$59,62 \pm 7,08^a$	$15,40 \pm 4,25^c$

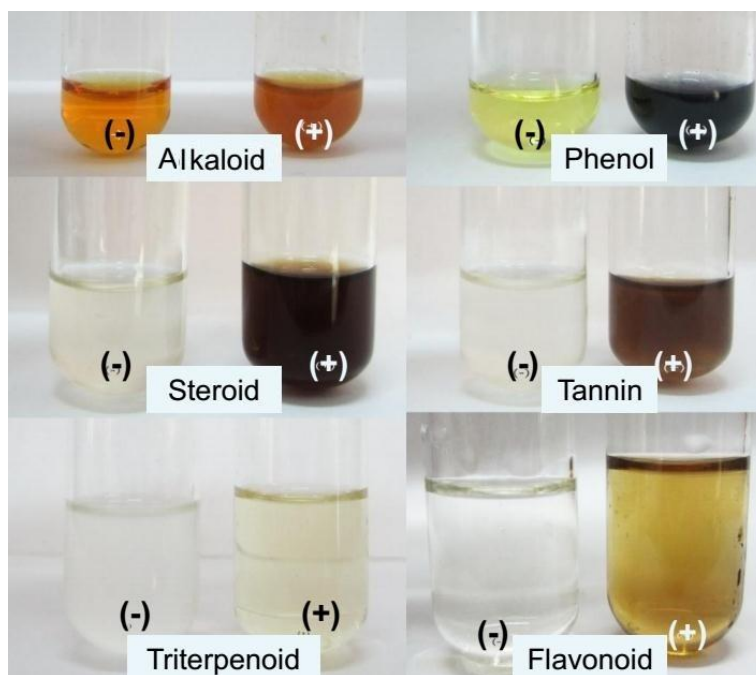
(a,b,c là thứ tự phân hạng)

Định tính các hợp chất thứ cấp trên mẫu cao thân leo cây Huỳnh Anh

Bảng 6. Kết quả định tính các nhóm chất hóa học trên mẫu cao thân leo

Alkaloid	Triterpenoid	Steroid	Saponin	Phenol	Tannin	Flavonoid
----------	--------------	---------	---------	--------	--------	-----------

+	+	+	-	+	+	+
---	---	---	---	---	---	---

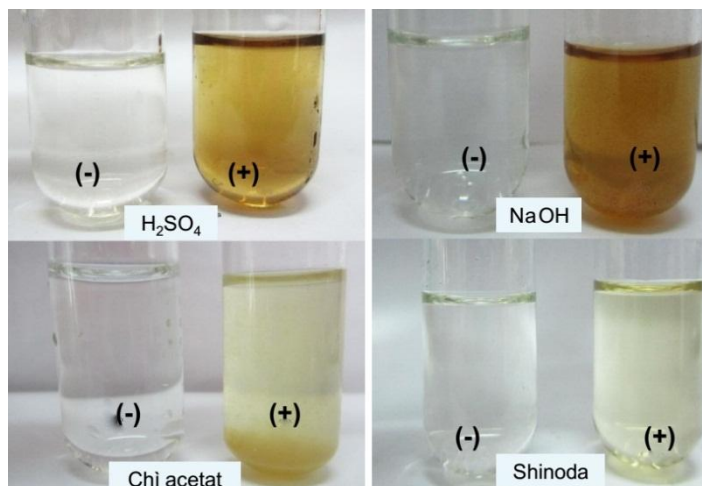


Hình 3. Kết quả định tính các nhóm chất hóa học trên mẫu cao thân leo

Kết quả trình bày trong Bảng 6 và Hình 3 và cộng sự, khi sàng lọc các nhóm chức trên mẫu cũng tương đồng với nghiên cứu của Elita Scio lá cao *Allamanda cathartica*.

Bảng 7. Bảng phân tích thành phần flavonoid bằng các phản ứng màu

Thí nghiệm	Hiện tượng	Nhóm chất dự đoán					
		Flavane	Flavanone	Flavone	Flavonol	Flavanonol	Chalcone
Chì acetate	Tủa vàng	+	+	+	+	+	+
Shinoda	Vàng nhạt	+					+
H ₂ SO ₄	Cam, đỏ		+				+
NaOH	Cam, đỏ				+		+



Hình 4. Kết quả các thí nghiệm phân tích thành phần flavonoid

Bằng các phản ứng với các thuốc thử có thể dự đoán được dạng flavonoid chính trong cao thân leo. Khi phản ứng với chì acetate, hầu hết các nhóm đều có khả năng tạo phức tủa. Trong phản ứng Shinoda, mẫu có màu vàng nhạt (âm tính) chứng tỏ các flavonoid dạng flavane hoặc chalcone. Khi phản ứng với H_2SO_4 , NaOH, sản phẩm màu cam, đỏ chứng tỏ mẫu thử có flavanone, flavonol và chalcone. Tuy nhiên, nếu trong mẫu thử có flavanon, flavonol thì phản ứng Shinoda phải có màu đỏ, cam. Vậy nên trong mẫu không có flavanone, flavonol. Mặt khác

flavan dễ bị biến tính tạo màu cam, đỏ khi tác dụng với acid hay kiềm mạnh. Vì vậy, flavonoid trong cao thân leo có thể là chalcone và flavane[1].

KẾT LUẬN

Cao thân leo Huỳnh Anh có hoạt tính kháng khuẩn (*S.aureus*), kháng oxy hóa, ức chế tyrosinase cao nhất. Trong cao thân leo có: alkaloid, triterpenoid, steroid, phenol, tannin, flavonoid. Flavonoid có thể ở dạng flavane hoặc chalcone.

Studying antibacterial, antioxidant and tyrosinase inhibition activities of golden trumpet (*Allamanda neriifolia*)

•Tran Pham Tue Hung

•Nguyen Thi My Hanh

•Quach Ngo Diem Phuong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Golden Trumpet (*Allamanda neriifolia*) was investigated through antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase activities. Ethanol extracts of plant parts: leaves, stems, roots, buds were used, which resulted in the most highlighted qualification of buds.

Key words: Tyrosinase inhibition, Golden Trumpet (*Allamanda neriifolia*), antioxidant.

Phytochemical identification of buds' extract indicated the presence of alkaloids, steroids, triterpenoids, phenols, tannins, flavonoids. Flavonoids possibly are flavanes or chalcones.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N.K.P. Phung, Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, *Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh*, 80-147 (2007).
- [2]. A. Hameed, G. Nawaz and T. Gulzar, Short communication: Chemical composition, antioxidant activities and protein profiling of different parts of *Allamanda cathartica*, *Natural Product Research* (2014).
- [3]. O.A. Conrad., I.P. Dike, U. Agbara., *In vivo* antioxidant assessment of two antimalarial plants - *Allamanda cathartica* and *Bixa orellana*, *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(5), 1-6 (2012).
- [4]. K. Yamauchi, T. Mitsunaga and I. Batubara, Isolation, identification and tyrosinase inhibitory activities of the extracts from *Allamanda cathartica*, *Natural Resources*, 2(3), 167-172 (2011).
- [5]. I. Batubara, L.K. Darusman, T. Mitsunaga, M. Rahminiwati, E. Djauhari, Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent, *Journal of Biological Sciences*, 10(2), 138-144 (2010).
- [6]. G. Prota, Progress in the chemistry of melanins and related metabolites, *Med. Res. Rev.*, 8(4), 525-556 (1988).
- [7]. D.F.N. Schmidt, R.A. Yunes, E. H. Schaab, A. Malheiros and V. C. Filho *et al.*, Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetti* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells, *Pharm Pharmaceut Sci*, 9(2), 200-208 (2006).
- [8]. R. Singh, P. Kharb, K. Rani, Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus* *in vitro* using different explants, *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 699-704 (2011).
- [9]. P.M. Souza, S.T. Elias, L.A. Simeoni, J.E. D. Paula, S.M. Gomes, E.N. Guerra, Y.M. Fonseca, E.C. Silva, D. Silveira, P.O. Magalhães, Plants from Brazilian cerrado

- with potent tyrosinase inhibitory activity, *Plos one*, 7(11), 48589 (2012).
- [10]. S. Pulipati, V. Siddartha, Evaluation of antibacterial activity of flower extracts of *Allamanda cathartica*, L., *IJPWR*, 3(2), 12 (2012).
- [11]. Xiaoying, C.W.J.M. Ronald, H.R.C.S.S. Hongbo, Z.D.Q.H.I. Maibach., Human *in vivo* and *in vitro* hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition, *Toxicol. Environ. Health A*, 54, 301–317 (1998).