

Tối ưu hóa trích ly cao chiết có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase từ lá *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Vũ Thị Ái Xuân^{1,2}, Lê Minh Tấn^{1,2}, Hà Cẩm Anh^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Trường Đại học Bách khoa (HCMUT), 268 Lý Thường Kiệt, Phường 14, Quận 10, TPHCM, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (VNU-HCM), Phường Linh Trung, Quận Thủ Đức, TPHCM, Việt Nam

Liên hệ

Hà Cẩm Anh, Trường Đại học Bách khoa (HCMUT), 268 Lý Thường Kiệt, Phường 14, Quận 10, TPHCM, Việt Nam

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (VNU-HCM), Phường Linh Trung, Quận Thủ Đức, TPHCM, Việt Nam

Email: hcanh@hcmut.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 23-3-2020
- Ngày chấp nhận: 12-12-2020
- Ngày đăng: 31-12-2020

DOI :10.32508/stjjet.v3i4.692



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, ngành hợp chất tự nhiên đã thu hút được mối quan tâm của các nhà khoa học. Cây nghệ, *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják mặc dù đã được ứng dụng trong đông y và bài thuốc dân gian nhưng vẫn chưa được nghiên cứu sâu về thành phần cũng như hoạt tính sinh học. Qua thực nghiệm, việc xác định có mặt các nhóm chất polyphenol, flavonoid và alkaloid cùng với giá trị $IC_{50}=127,99 \mu\text{g/mL}$ xác định trong thí nghiệm kiểm tra sơ bộ *in vitro* cho thấy cây nghệ có tiềm năng ức chế enzyme tyrosinase. Để có thể mở rộng ứng dụng cây nghệ vào dược mỹ phẩm, trong nghiên cứu này quy trình trích ly lá *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják để thu cao chiết có khả năng ức chế enzyme tyrosinase cao đã được tối ưu bằng phương pháp RSM kết hợp với thực nghiệm. Các yếu tố khảo sát bao gồm: nồng độ ethanol (%), nhiệt độ chiết ($^{\circ}\text{C}$), tỉ lệ rắn/lỏng (g/mL) và thời gian chiết (phút). Phương trình hồi quy thu được cho thấy tất cả yếu tố khảo sát trên đều ảnh hưởng đến khả năng ức chế enzyme tyrosinase của cao chiết. Các thông số trích ly lá nghệ tối ưu gồm nồng độ ethanol 64%, nhiệt độ chiết $56,5^{\circ}\text{C}$, tỉ lệ rắn/lỏng 1:8,18 g/mL và thời gian chiết 13,96 phút được đề xuất dựa trên kết quả chạy phần mềm Design Expert 11.0.4. Cao chiết thu được đạt giá trị IC_{50} tính toán là $56,39 \mu\text{g/mL}$. Kết quả mô phỏng này phù hợp với với điều kiện trích ly tối ưu được xác định bằng thực nghiệm gồm: nồng độ ethanol 64%, nhiệt độ chiết 56°C , tỉ lệ rắn lỏng 1:8 g/mL và thời gian chiết 14 phút. Cao chiết trích ly ở điều kiện tối ưu có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase cao, với giá trị IC_{50} là $56,69 \mu\text{g/mL}$, thấp hơn gấp 2,5 lần so với kết quả thu được ở điều kiện trích ly sơ bộ ban đầu ($IC_{50}=127,99 \mu\text{g/mL}$). Kết quả nghiên cứu chứng minh phương pháp bề mặt đáp ứng là phù hợp cho mô phỏng quá trình chiết lá nghệ với sai số tương đồng giữa mô hình và thực nghiệm rất nhỏ ($<0,5\%$).

Từ khóa: ức chế enzyme tyrosinase, lá nghệ, tối ưu hóa, đáp ứng bề mặt

GIỚI THIỆU

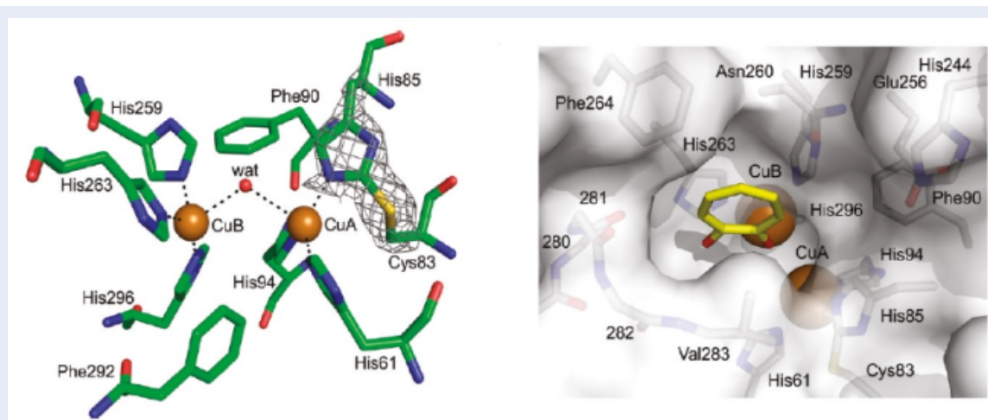
Tyrosinase là xúc tác enzyme quan trọng trong quá trình tổng hợp sắc tố melanin; quyết định màu của tóc, da và mắt¹. Do đó, sự ức chế tyrosinase là bước quan trọng để điều chỉnh sự tổng hợp melanin dư thừa, bao gồm cả việc sử dụng chiết xuất của thực vật hoặc các hóa chất tổng hợp.

Tyrosinase hay còn gọi là enzyme polyphenol oxidase² với trung tâm hoạt động (active site) có 2 nguyên tử đồng, mỗi nguyên tử này tạo liên kết với 3 phân tử histamine và chứa các acid amin như Val283, Phe264, His244, Asn260,... (Hình 1)³.

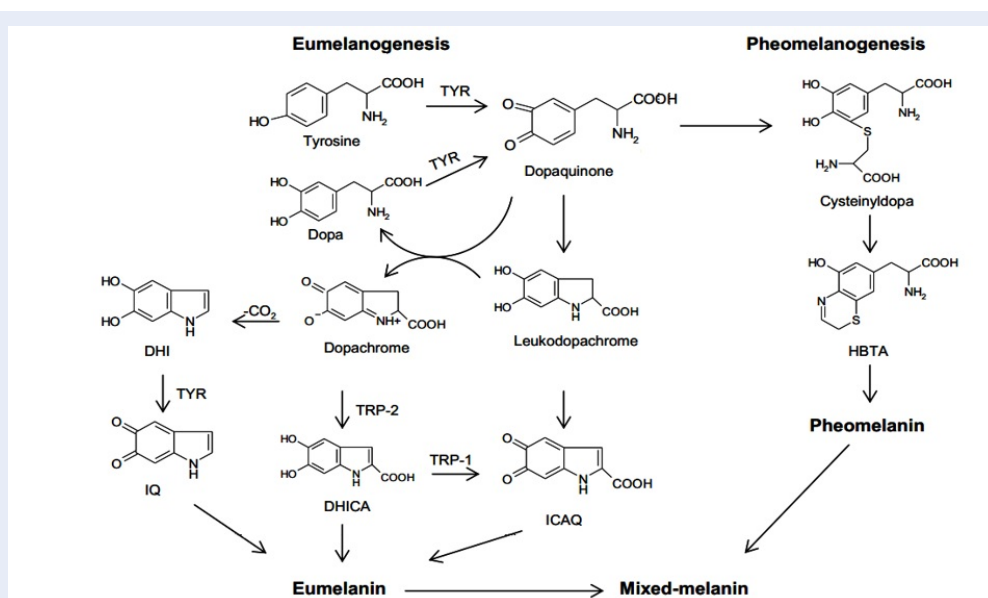
Theo quy trình sinh tổng hợp melanin do Raper-Mason đề xuất (Hình 2)⁴, enzyme tyrosinase tham gia vào quá trình hydroxyl hóa monophenol (L-tyrosinase) và o-diphenols (Dopa), tạo thành dopaquinone. Dopaquinone là một chất hoạt động mạnh nên có thể tự oxy hóa thành dopachrome, tiếp

theo, dopachrome sẽ chuyển hóa thành dihydroxyindole (DHI) hoặc dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) để cuối cùng tạo thành eumelanin, sắc tố có màu nâu-đen. Mặt khác, nếu có mặt cysteine hoặc glutathione, dopaquinone sẽ chuyển thành cysteinyl-dopa hoặc glutathionyl-dopa, cuối cùng tạo thành pheomelanin, sắc tố có màu vàng-đỏ⁵. Nhờ có vai trò quan trọng trong hình thành các sắc tố da, nên việc nghiên cứu khả năng ức chế enzyme tyrosinase là cần thiết, góp phần hỗ trợ trong việc điều trị các bệnh lý liên quan đến sắc tố da, hoặc làm trắng da⁶. Nghệ (*Persicaria pulchra* (Bl.) Soják) là loài thảo mộc, thân phủ đầy lông. Lá hình ngọn giáo dài, thon hẹp ở hai đầu, rộng 1,5 cm, có rãnh dọc và có cuống ngắn. Phiến lá dày, lông trắng. Bẹ chia mỏng và phát triển. Hoa đỏ mọc thành bông ở đầu hay kẽ lá, Nghệ là một loại cây mọc hoang đặc biệt là ở nơi ẩm thấp. Chúng xuất hiện khắp nơi ở Việt Nam và các nước châu Á khác như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia và các nước châu Âu⁷.

Trích dẫn bài báo này: Xuân V T A, Tấn L M, Anh H C. Tối ưu hóa trích ly cao chiết có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase từ lá *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. *Sci. Tech. Dev. J. - Eng. Tech.*; 3(4):558-568.



Hình 1: Vùng trung tâm hoạt động enzyme tyrosinase³.



Hình 2: Quy trình sinh tổng hợp melanin theo Raper-Mason⁵.

Trong dân gian, nhựa cây nghệ được dùng để giải nhiệt, chữa ho; theo y học cổ truyền, cây nghệ có tác dụng cầm máu, nhuận tràng, tẩy giun và làm trắng da^{8,9}. Cao nghệ lỏng còn được dùng làm thuốc co tử cung, thuốc cầm máu nội.⁸

Năm 2007, Miyazawa M. và cộng sự đã phân lập được (2R,3R)-(+)-taxifolin trong mầm hạt *Polygonum hydropiper L.* (*Persicaria hydropiper L.*), một loài cây cùng họ với cây *Persicaria pulchra*, các chất này có khả năng ức chế tyrosinase tương đương với kojic acid và mạnh hơn arbutin, có thể ứng dụng trong mỹ phẩm làm trắng da¹⁰. Năm 2011, hoa *Persicaria tinctoria*, một loài cây cùng họ với cây *Persicaria pulchra*, được Woo Young Min và cộng sự chứng minh khả năng ức

chế tyrosinase với $IC_{50} = 70.8 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$ ¹¹.

Tuy nhiên việc nghiên cứu hiện nay cũng chỉ mới thực hiện trên vài loài nêu trên của họ *Persicaria*, trong khi đó *Persicaria pulchra* (Bl.) vẫn chưa được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Đặc biệt, chưa có công trình nghiên cứu được công bố về khả năng ức chế enzyme tyrosinase của những loại nghệ này dù phân bố rộng rãi khắp đất nước Việt Nam⁷. Do đó, việc chọn nghệ như một đối tượng nghiên cứu là điều cần thiết nhằm góp phần phát hiện những giá trị tiềm năng của cây nghệ, nâng cao sự hiểu biết của con người về cây nghệ, tạo tiền đề hay ý tưởng cho các công trình nghiên cứu tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là lá nghệ (*Persicaria pulchra* (Bl.) Soják), đã được định danh tại bộ môn Sinh thái – Sinh học tiến hóa, Khoa Sinh học, Trường Đại Học Khoa học Tự Nhiên thuộc Đại Học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh. Nguyên liệu được thu hái vào tháng 5/2018 tại huyện Bình Chánh, Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyên liệu sau khi thu hái được rửa sạch và phơi khô trong bóng râm đến độ ẩm dưới 12%, xay nhỏ và rây ở kích thước nhỏ hơn 0,1cm; sau đó được đóng gói, bảo quản và sử dụng trong thời gian 3 tháng.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết

Nguyên liệu được chiết trong dung môi ethanol ở các điều kiện về nồng độ dung môi, thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ rắn/lỏng khác nhau với số lần chiết là 2 lần. Dịch chiết được làm bay hơi dung môi trong máy cô quay chân không ở nhiệt độ từ 50-55 °C, sau đó mẫu cao được bảo quản ở -21 °C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Các hóa chất sử dụng bao gồm: Enzyme tyrosinase (Sigma Chemical Co.), L-Dopa (Sigma Chemical Co.), Gallic acid (Sigma Chemical Co.), DPPH (1,1-Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl) (Sigma Chemical Co.), Ascorbic acid (Sigma Chemical Co.), Kojic acid (Sigma Chemical Co.), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co.) và một số hóa chất khác.

Phương pháp sơ bộ hóa thực vật

Cao chiết được tiến hành sơ bộ định tính các nhóm hoạt chất có khả năng ức chế enzyme tyrosinase: định tính nhóm flavonoid theo phản ứng cyaniding và phản ứng với thuốc thử chì acetate kiềm, định tính nhóm polyphenol theo phản ứng với thuốc thử FeCl₃, định tính nhóm alkaloid: theo phản ứng với thuốc thử Dragendorff^{12,13}.

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM)

Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology: RSM) theo mô hình CCD (central composite design) để tối ưu khả năng ức chế enzyme tyrosinase của mẫu cao khi chiết ở các điều kiện khác nhau. Trong nghiên cứu này, các yếu tố được lựa chọn để khảo sát sự ảnh hưởng đến quá trình chiết bao gồm nồng độ ethanol, thời gian, tỉ lệ rắn/lỏng và nhiệt độ được trình bày ở Bảng 1.

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzyme tyrosinase.

Enzyme tyrosinase và L-dopa được hòa tan trong đệm photphate với nồng độ lần lượt là 31 U/mL và 2,5 mM. Mẫu cao chiết được hòa tan trong dung dịch dimethyl sulfoxit (DMSO) 50%. Mẫu thử được tạo nên bằng cách trộn 40 mL enzyme 31 U/mL, 40 mL dịch chiết đã được pha trong DMSO ở nồng độ xác định với 80 mL đệm phosphate (0.1 M, pH 6.8). Sau đó, 40 mL L-Dopa 2,5 mM được thêm vào mẫu thử và hỗn hợp được ủ trong thời gian 5 phút tại 25 °C. Lượng dopachrome được sinh ra trong hỗn hợp sau phản ứng được xác định thông qua độ hấp thụ ở bước sóng 475nm bằng máy đọc khay vi thể (Microplate Reader), và acid kojic được chọn làm chứng dương. Khả năng ức chế enzyme của cao chiết được xác định theo công thức:

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

Trong đó:

A: Độ hấp thụ của mẫu có chứa enzyme và L-dopa, dịch chiết được thay bằng DMSO 5% (mẫu trắng)

B: Độ hấp thụ của mẫu có chứa L-dopa, enzyme được thay bằng đệm photphate, dịch chiết được thay bằng DMSO 5%.

C: Độ hấp thụ của mẫu có chứa L-dopa, enzyme được thay bằng đệm photphate, dịch chiết

D: Độ hấp thụ của mẫu có chứa L-dopa, enzyme được thay bằng đệm photphate, dịch chiết.

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần và sử dụng kết quả trung bình của ba lần thí nghiệm¹⁴.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá khả năng ức chế của cao chiết lá nghệ

Đầu tiên, thử nghiệm sơ bộ thực vật để xác định sự có mặt của một số hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase tiêu biểu như polyphenol, flavonoid và alkaloid^{9,12,15}. Kết quả Bảng 2 cho thấy cao nghệ có mặt tất cả ba hợp chất trên, giúp phần nào dự đoán được hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của cây nghệ. Điều này được khẳng định bằng kết quả thí nghiệm *in vitro* với giá trị IC₅₀ đạt 127,99 mg/mL. So với kết quả nghiên cứu khả năng ức chế của 101 loài thực vật của tác giả Jung-Hee Hwang và Byung Mu Lee, cho thấy cây nghệ có khả năng ức chế enzyme tyrosinase vượt trội¹⁶.

Như vậy, từ kết quả thí nghiệm sơ bộ cho thấy tiềm năng ức chế enzyme tyrosinase của cao chiết lá nghệ. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng rộng hơn vào ngành dược mỹ phẩm cần phải tối ưu các điều kiện chiết để thu được cao chiết có hoạt tính tốt nhất.

Bảng 1: Các giá trị của thông số cần khảo sát

Nồng độ cồn (%) (X ₁)	Nhiệt độ (°C) (X ₂)	Tỉ lệ rắn/lỏng (g/mL) (X ₃)	Thời gian (phút) (X ₄)
0	30	1:5	15
30	40	1:10	30
60	60	1:15	90
100	80	1:20	120

Bảng 2: Kết quả sơ bộ hóa thực vật

Hợp chất	polyphenol	flavonoid	alkaloid
Kết quả định tính	++	+	+

Ghi chú: ++ có mặt hoạt chất với hàm lượng cao
+ có mặt hoạt chất

Sự ảnh hưởng của các yếu tố đến hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của cao chiết

Sự ảnh hưởng của các yếu tố trích ly đến khả năng ức chế enzyme tyrosinase của cao chiết được thể hiện trong Hình 3.

Hình 3a cho thấy khả năng ức chế enzyme tốt nhất ở nồng độ ethanol là 60%. Cồn là dung môi có độ phân cực trung bình nên ở nồng độ cồn này sẽ chiết được các hợp chất có độ phân cực trung bình như các hợp chất thuộc nhóm polyphenol, flavonoid,...¹⁷, có khả năng ức chế enzyme tyrosinase mạnh¹⁸⁻²². Nhiều nghiên cứu khác cũng nhận được kết quả tương tự với nồng độ ethanol tốt nhất nằm ở khoảng này^{23,24}. Mặt khác, mẫu cao được chiết bằng nước không thể hiện hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase. Điều này có thể giải thích như sau, nước là dung môi có độ phân cực cao (chỉ số phân cực 9,0) chiết được những hợp chất có độ phân cực cao chủ yếu là các chất màu thực vật như chlorophyll, glycoside, gôm, nhầy, các muối vô cơ¹⁷, các hợp chất này chưa được ghi nhận về khả năng ức chế enzyme tyrosinase.

Khi tăng nhiệt độ, khả năng khuếch tán của các chất vào dung môi tăng²⁵ nên quá trình chiết diễn ra nhanh hơn. Đồ thị ở Hình 3b cho thấy khả năng ức chế enzyme, thể hiện qua giá trị IC₅₀, tăng khi tăng nhiệt độ từ 30 °C lên 60 °C và đạt giá trị IC₅₀ thấp nhất (60,44 µg/mL) ở 60 °C, sau đó hoạt tính giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ do sự phân hủy của các chất kém bền với nhiệt độ. Ở nhiệt độ 30 °C quá trình chiết diễn ra chậm do ở nhiệt độ thấp khả năng khuếch tán của dung môi vào các tế bào thực vật giảm²⁴.

Sự ảnh hưởng của tỉ lệ rắn/lỏng đến hoạt tính ức chế enzyme của cao chiết được thể hiện ở Hình 3c. Có sự chênh lệch rõ rệt giữa các tỉ lệ khác nhau, hoạt tính ức chế tyrosinase tăng khi giảm tỉ lệ rắn/lỏng từ 1:5 xuống 1:10 và đạt giá trị ức chế tyrosinase tốt nhất ở

tỷ lệ này. Tiếp tục giảm tỉ lệ rắn/lỏng hoạt tính của cao chiết giảm dần. Điều này được giải thích như sau, với tỉ lệ 1:5 lượng dung môi quá ít không thể chiết được nhiều hoạt chất. Ngược lại, việc sử dụng lượng dư dung môi sẽ làm tăng thể tích dịch chiết, thời gian gia nhiệt lâu dẫn đến một số chất bị biến tính. Như vậy, 1:10 là tỉ lệ rắn/lỏng phù hợp để đạt được kết quả tối ưu.

Thời gian chiết là yếu tố cũng có tác động đáng kể đến việc chiết xuất các hợp chất sinh học trong dược liệu²⁶. Kết quả ở Hình 3d cho thấy tăng thời gian chiết trong khoảng 15 đến 120 phút hoạt tính ức chế enzyme giảm dần. Tại thời gian chiết 15 phút thu được cao có hoạt tính ức chế tyrosinase tốt nhất. Hoạt tính của cao chiết khi thực hiện trong thời gian 120 phút là thấp nhất do thời gian chiết quá dài trong dịch chiết có nhiều tạp chất và các hoạt chất bị phân hủy theo thời gian²⁵.

Như vậy, từ kết quả khảo sát thực nghiệm điều kiện chiết phù hợp nhất được lựa chọn như sau: nồng độ ethanol là 60%, nhiệt độ 60 °C, thời gian chiết 15 phút với tỉ lệ rắn/lỏng là 1:10 g/mL. Ở điều kiện này, cao chiết có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase cao nhất với IC₅₀= 56,69 µg/mL. Do đó, điều kiện này được chọn làm điểm ở tâm cho thí nghiệm đáp ứng bề mặt (RSM).

Kết quả quy hoạch thực nghiệm

Từ kết quả ức chế enzyme tyrosinase của 36 thí nghiệm quy hoạch cho thấy các thí nghiệm ở tâm (từ thí nghiệm số 25 đến thí nghiệm số 36) thể hiện hoạt tính tốt nhất (IC₅₀= 56,59 ÷ 56,76 µg/mL), chỉ kém hơn kojic acid khoảng 5 lần và có sự lặp lại giữa các thí nghiệm ở tâm. Các thí nghiệm vùng biên khảo sát có giá trị IC₅₀ tương đối cao, trong đó thí nghiệm số 11 có khả năng ức chế enzyme tyrosinase thấp nhất (IC₅₀= 112,88 µg/mL).

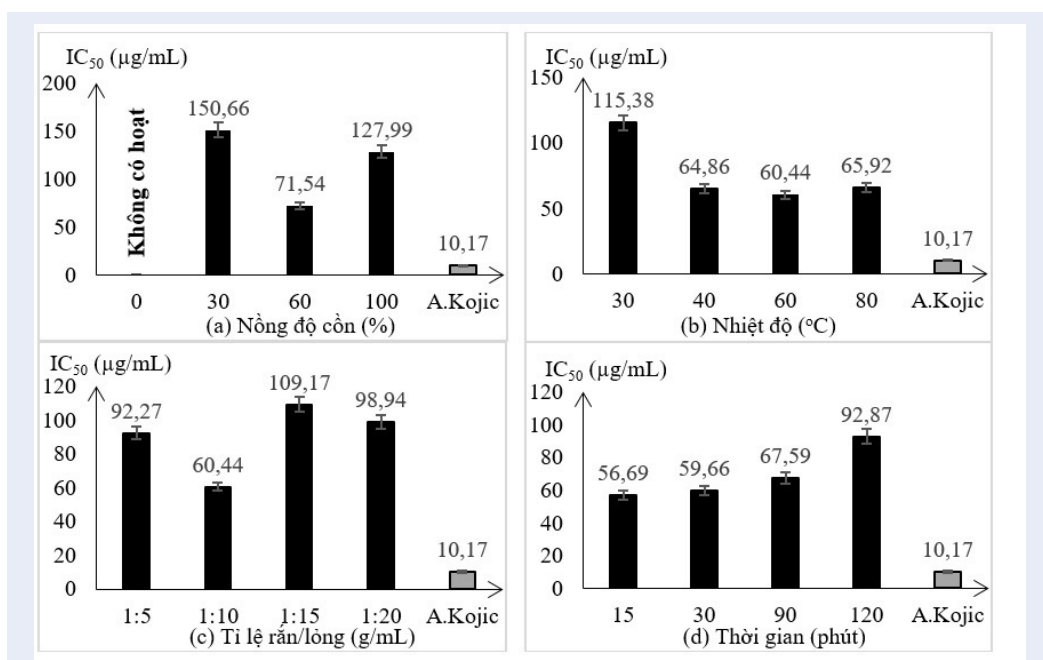
Bảng 3: Bảng quy hoạch thực nghiệm

STT	Điều kiện khảo sát					IC ₅₀ (μg/mL)
	Nồng độ cồn (%)	Nhiệt độ (°C)	Tỉ lệ rắn/lỏng (g/mL)	Thời gian (phút)		
1	-1 (50)	-1 (70)	-1 (1:5)	-1 (10)		68,35
2	1 (70)	-1 (70)	-1 (1:5)	-1 (10)		66,42
3	-1 (50)	1 (50)	-1 (1:5)	-1 (10)		73,79
4	1 (70)	1 (50)	-1 (1:5)	-1 (10)		72,42
5	-1 (50)	-1 (70)	1 (1:15)	-1 (10)		76,80
6	1 (70)	-1 (70)	1 (1:15)	-1 (10)		104,56
7	-1 (50)	1 (50)	1 (1:15)	-1 (10)		85,12
8	1 (70)	1 (50)	1 (1:15)	-1 (10)		104,62
9	-1 (50)	-1 (70)	-1 (1:5)	1 (20)		99,90
10	1 (70)	-1 (70)	-1 (1:5)	1 (20)		72,96
11	-1 (50)	1 (50)	-1 (1:5)	1 (20)		112,88
12	1 (70)	1 (50)	-1 (1:5)	1 (20)		75,83
13	-1 (50)	-1 (70)	1 (1:15)	1 (20)		76,15
14	1 (70)	-1 (70)	1 (1:15)	1 (20)		71,79
15	-1 (50)	1 (50)	1 (1:15)	1 (20)		73,30
16	1 (70)	1 (50)	1 (1:15)	1 (20)		69,36
17	-2 (40)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		88,63
18	2 (80)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		82,67
19	0 (60)	-2 (80)	0 (1:10)	0 (15)		70,56
20	0 (60)	2 (40)	0 (1:10)	0 (15)		71,23
21	0(60)	0 (60)	-2 (1:1)	0 (15)		85,35
22	0 (60)	0 (60)	2 (1:20)	0 (15)		96,23
23	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	-2 (5)		73,88
24	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	2 (25)		74,46
25	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,65
27	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,63
28	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,65
29	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,64
30	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,65
31	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,66
32	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
33	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
34	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,76
35	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,70
36	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
26	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
27	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,63
28	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,65
29	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,64
30	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,65
31	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,66
32	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
33	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
34	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,76
35	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,70
36	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,59
31	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)		56,66

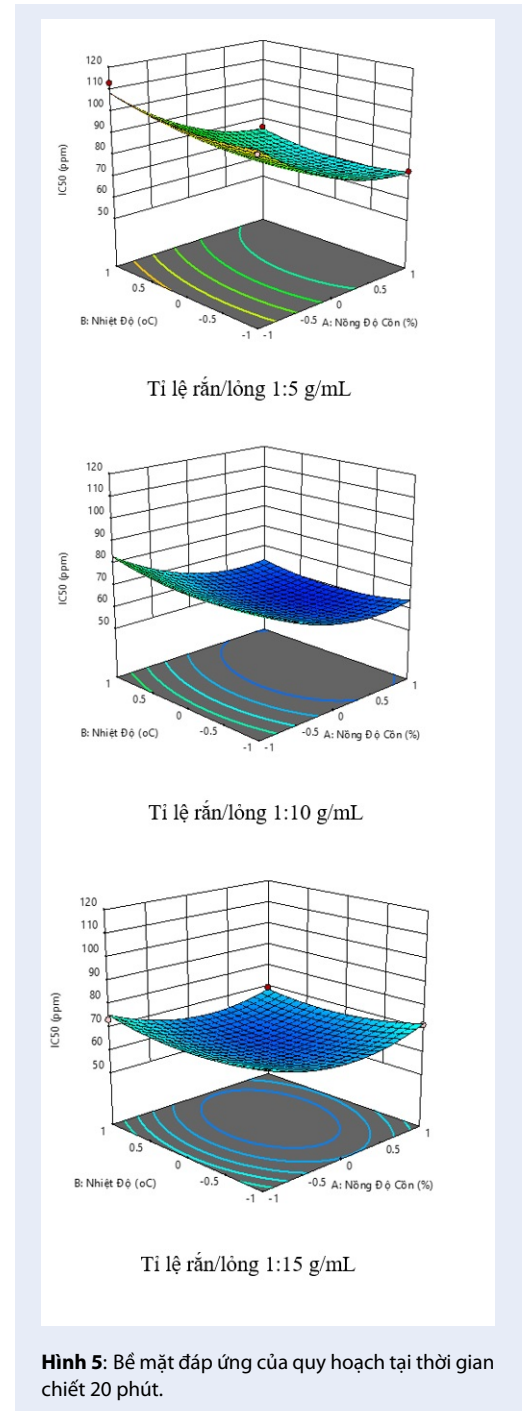
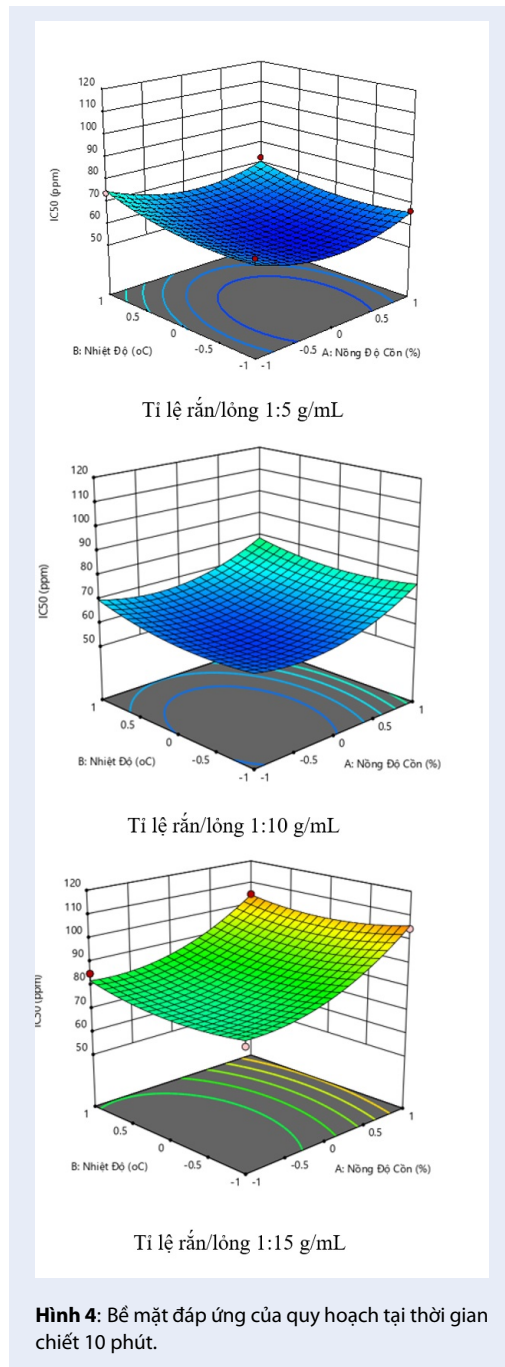
Continued on next page

Table 3 continued

32	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)	56,59
33	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)	56,59
34	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)	56,76
35	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)	56,70
36	0 (60)	0 (60)	0 (1:10)	0 (15)	56,60



Hình 3: Sự ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng ức chế enzyme tyrosinase của các mẫu cao chiết: a) nồng độ cồn, b) nhiệt độ, c) tỷ lệ rắn/lỏng, d) thời gian chiết.



Kết quả quy hoạch thực nghiệm (Hình 4 và Hình 5) cho thấy cả 4 yếu tố đều có ảnh hưởng đến khả năng ức chế enzyme tyrosinase, phù hợp với xu hướng chung khi chiết xuất các hợp chất tự nhiên từ thực vật²⁷. Để thấy rõ hơn mức độ ảnh hưởng đó cần xem xét phương trình hồi quy được xây dựng dựa trên các số liệu có được từ quy hoạch thực nghiệm với hàm mục tiêu là khả năng ức chế enzyme tyrosinase (mục 3.3).

Kết quả phân tích

Bảng việc xử lý các số liệu thực nghiệm, đánh giá sự tương thích giữa mô hình hóa và thực nghiệm. Sự đánh giá dựa trên kết quả của hệ số xác định, hệ số R^2 của mô hình và kết quả phân tích phương sai. Các kết quả thể hiện ở Bảng 4 được xuất từ phần mềm Design Expert 11.0.4.

Kết quả phân tích phương sai (Bảng 4) cho thấy có sự tương quan chặt chẽ giữa mô hình và thực nghiệm do hệ số R^2 có giá trị 0,9907, nghĩa là có 99,07% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu được dự đoán theo mô hình. Đồng thời, sai số giữa kết quả thực nghiệm và kết quả theo mô hình là (C.V. %) là 2,7% cũng thể hiện tính đúng đắn của mô hình. Giá trị R^2 dự đoán (*Predicted* R^2) là 0,9467 phù hợp với giá trị R^2 hiệu chỉnh (*Adjusted* R^2) là 0,9846 do sự sai lệch nằm trong khoảng cho phép (sai lệch ít hơn 0,2 đơn vị)²⁸. Thêm vào đó, độ chính xác phù hợp (*Adeq precision*) dùng để đo tín hiệu nhiễu có giá trị là 40,707 lớn hơn 4, nghĩa là có đầy đủ tín hiệu có thể đo và với giá trị này mô hình có thể được sử dụng để định hướng không gian thiết kế.

Từ kết quả xuất từ phần mềm Design Expert 11.0.4, phương trình hồi quy được viết đầy đủ dạng biến mã như sau:

$$Y = 56,6403 - 1,67683X_1 + 1,32137X_2 + 1,70354X_3 - 1,08669X_1X_2 + 6,64X_1X_3 - 7,26612X_1X_4 - 1,51125X_2X_3 - 10,0666X_3X_4 + 7,44171X_1^2 + 3,75327X_2^2 + 8,72758X_3^2 + 4,57321X_4^2$$

Theo bảng phân tích hồi quy (Bảng 5) giá trị P nhỏ hơn 0,05 chứng tỏ sự tác động của các yếu tố này đến khả năng ức chế hoạt tính của enzyme tyrosinase. Ngoài ra, phương trình hồi quy có sự xuất hiện của cả 4 biến X_1, X_2, X_3, X_4 lần lượt là nồng độ cồn, nhiệt độ, tỉ lệ lỏng/rắn, thời gian chiết. Điều này chứng tỏ các thông số này có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase. Trong phương trình hồi quy còn xuất hiện nhiều hệ số tương tác đôi cho thấy sự tương tác giữa hai trong 4 nhân tố bất kì có sự ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase. Các biến $X_1X_3, X_1X_4, X_3X_4, X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$ có giá trị p rất nhỏ, cho thấy chúng có tác động rất lớn đến hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase. Sự thiếu phù hợp (lack of fit) là 0,2546, lớn hơn giá trị $P_{value}=0,05$, do đó mô hình được dự đoán có độ tương thích cao với thực nghiệm. Ngoài ra, hệ số của các biến bình phương là số dương do vậy đồ thị hàm số của phương trình hồi quy sẽ là một mặt cong lõm có giá trị cực tiểu nằm lân cận giá trị 56,6403 $\mu\text{g/mL}$.

Từ những dữ kiện được đưa ra và thuật toán phân tích tối ưu của phần mềm Design Expert 11.0.4, điều kiện trích ly tối ưu được xác định là nồng độ ethanol

63%, nhiệt độ chiết 56,5 °C, tỉ lệ rắn/lỏng là 1:8,18 g/mL và thời gian chiết là 13,96 phút cho hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase đạt giá trị tối ưu ($IC_{50} = 56,39 \mu\text{g/mL}$). Để kiểm chứng sự tương thích giữa mô hình và thực nghiệm tiến hành thực nghiệm ở điều kiện chiết gytương ứng và so sánh kết quả với mô hình. Kết quả trung bình sau 3 lần thí nghiệm (Bảng 6) cho thấy có sự tương đồng giữa mô hình và thực nghiệm với sai số rất nhỏ, trong khoảng 0,22- 0,34% (xem Bảng 6).

KẾT LUẬN

Qua thí nghiệm khảo sát sơ bộ cho thấy lá nghệ là đối tượng có khả năng ức chế enzyme tyrosinase tiềm năng với giá trị $IC_{50}=127,99 \text{ mg/mL}$. Nhằm thu được cao chiết có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase cao nhất để ứng dụng vào ngành dược mỹ phẩm, nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa qui trình trích ly lá nghệ bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Từ đó, xác định được điều kiện tối ưu trích ly lá nghệ trong mô hình hóa như sau: sử dụng ethanol có nồng độ là 63% và tiến hành chiết xuất tại nhiệt độ 56,5 °C trong 13,98 phút với tỉ lệ rắn/lỏng 1:8,18 g/mL. Kiểm chứng bằng thực nghiệm, tại điều kiện trích ly tối ưu này mẫu cao nghệ có giá trị IC_{50} tốt nhất (56,39 mg/mL), cao hơn 2,5 lần so với điều kiện trích ly sơ bộ ban đầu ($IC_{50}=127,99 \text{ mg/mL}$). Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp bề mặt đáp ứng là công cụ hữu hiệu trong việc tối ưu hóa thực nghiệm và dự đoán hoạt tính của cao chiết với độ tương thích cao với số liệu thực nghiệm. Điều này giúp định hướng chính xác kế hoạch thực nghiệm và cho phép rút ngắn thời gian thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu đã góp phần khẳng định khả năng ứng dụng của cao chiết nghệ nhằm tạo ra sản phẩm làm trắng da và chữa các bệnh lý sắc tố da, những xu hướng phát triển ngành dược mỹ phẩm ngày nay.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2020-20-36. Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ thời gian, phương tiện và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả xin cam đoan rằng không có bất kỳ xung đột lợi ích nào trong công bố bài báo.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Hà Cẩm Anh tham gia vào việc đưa ra ý tưởng và kế hoạch nghiên cứu và đóng góp giải thích dữ liệu và kiểm tra lại bài viết

Bảng 4: Bảng phân tích phương sai

Std. Dev.	3,95	R ²	0,9907
Mean	145,94	Adjusted R ²	0,9846
C.V. %	2,70	Predicted R ²	0,9467
Lack of fit	0,2546		
Adeq Precision			40,7067

Bảng 5: Bảng phân tích hệ số hồi quy tương quan

Yếu tố	Hệ số	P (P < 0,05)	P _{chun} = 0,05
	Hằng số		56,6403
X ₁	-1,67683	0,0004	Nhận
X ₂	1,32137	0,0036	Nhận
X ₃	1,70354	0,0004	Nhận
X ₄	0,052375	0,8978	Loại
X ₁ X ₂	-1,08669	0,0389	Nhận
X ₁ X ₃	6,64	< 0,0001	Nhận
X ₁ X ₄	-7,26612	< 0,0001	Nhận
X ₂ X ₃	-1,51125	0,0059	Nhận
X ₂ X ₄	-0,57888	0,2536	Loại
X ₃ X ₄	-10,0666	< 0,0001	Nhận
X ₁ ²	7,44171	< 0,0001	Nhận
X ₂ ²	3,75327	< 0,0001	Nhận
X ₃ ²	8,72758	< 0,0001	Nhận
X ₄ ²	4,57321	< 0,0001	Nhận

Bảng 6: Thử nghiệm kiểm tra điểm tối ưu

Nồng độ cồn (%)	63
Nhiệt độ (°C)	59
Tỉ lệ rắn / lỏng (g/mL)	1:8
Thời gian (phút)	14
IC50 mô hình (μg/mL)	56,39
IC50 ± S.D (μg/mL)	Sai số so với mô hình(%)
56,45 ± 0,75	0,25
56,50 ± 1,2	0,34
56,44 ± 0,5	0,22
Trung bình	
56,46 ± 0,82	0,27

Vũ Thị Ái Xuân tham thực hiện thí nghiệm và viết bản thảo.

Lê Minh Tấn tham gia vào việc thực hiện thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol*. 2011;131(E1):E8–E11. PMID: 22094404. Available from: <https://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>.
- Khan MTH. Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure Applied Chemistry*. 2007;79(12):2277–2295. Available from: <https://doi.org/10.1351/pac200779122277>.
- Ismaya WT, et al. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. 2011;50(24):5477–5486. PMID: 21598903. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi200395t>.
- Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(6):2440–2475. PMID: 19582213. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>.
- Parvez S, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2006;20(11):921–934. PMID: 16841367. Available from: <https://doi.org/10.1002/ptr.1954>.
- Kassouf C, et al. Human Tyrosinase: Temperature-Dependent Kinetics of Oxidase Activity. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(3):895. PMID: 32019134. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21030895>.
- Lợi DT. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học Nhà xuất bản Thời Đại, 2004;.
- Vân THNT. Dược liệu học. 2011; p. 390–391.
- Abad SA, Sirat HM, Taher M. Tyrosinase inhibition, anti-acetylcholinesterase, and antimicrobial activities of the phytochemicals from *Gynotroches axillaris* Blume. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2016;29(6):2071–2078.
- Miyazawa M, Tamura NJB, Bulletin P. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L.(Benitade). 2007;30(3):595–597. PMID: 17329865. Available from: <https://doi.org/10.1248/bpb.30.595>.
- Woo YM, et al. Tyrosinase inhibitory compounds isolated from *Persicaria tinctoria* flower. *Journal of Applied Biological Chemistry*, vol. 54, no. 1, pp. 47-50, 2011; Available from: <https://doi.org/10.3839/jabc.2011.008>.
- Thu NV. Bài giảng dược liệu, tập 1. Trường Đại học Dược Hà Nội. 1998; p. 247–249.
- Kỳ PT, Tâm NT, Thanh TV. Bài giảng dược liệu, tập 2. Trường Đại học Dược Hà Nội. 2002;.
- Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*. 2005;69(1):197–201. PMID: 15665485. Available from: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>.
- Shaheen F, et al. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry*. 2005;66(8):935–940. PMID: 15934134. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.010>.
- Hwang JH, Lee BM. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. 2007;70(5):393–407. PMID: 17454565. Available from: <https://doi.org/10.1080/10937400600882871>.
- Phụng NKP. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. 2007; p. 23–24.
- No JK, et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life sciences*. 1999;65(21):PL241–PL246. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00492-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00492-0).
- Kubo I, et al. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic medicinal chemistry*. 2000;8(7):1749–1755. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00102-4).
- Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Vieira W, Virador V. Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. *Journal of Agricultural, Food Chemistry*. 2001;49(3):1620–1624. PMID: 11312905. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf001116h>.
- Kubo I, Kinoshita H. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of agricultural, food chemistry*. 1999;47(10):4121–4125. PMID: 10552777. Available from: <https://doi.org/10.1021/jf990201q>.
- Hasan A, Nashrianto H, Juhaeni R, Artika I. Optimization of conditions for flavonoids extraction from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Pharm Lett*. 2016;8(18):114–120.
- Sheng ZL, Wan PF, Dong CL, Li YH. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2013;43:778–786. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.020>.
- Visscher M, Johnson J. The Fick principle: analysis of potential errors in its conventional application. *Journal of applied physiology*. 1953;5(10):635–638. PMID: 13044747. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappl.1953.5.10.635>.
- Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology, biotechnology*. 2013;51(1):84–91.
- González-Montelongo R, Lobo MG, González M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*. 2010;119(3):1030–1039. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>.
- Belwal T, Dhyani P, Bhatt ID, Rawal RS, Pande V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food chemistry*. 2016;207:115–124. PMID: 27080887. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.081>.
- Harel O. The estimation of R² and adjusted R² in incomplete data sets using multiple imputation. *Journal of Applied Statistics*. 2009;36(10):1109–1118. Available from: <https://doi.org/10.1080/02664760802553000>.

Optimization of anti-tyrosinase activity in extraction of *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják by using Response Surface Methodology (RSM)

Vu Thi Ai Xuan^{1,2}, Le Minh Tan^{1,2}, Ha Cam Anh^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), 268 Ly Thuong Kiet, Ward 14, District 10, HCMC, Vietnam

²Vietnam National University - Ho Chi Minh City (VNU-HCM), Linh Trung Ward, Thu Duc District, HCMC, Vietnam

Correspondence

Ha Cam Anh, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), 268 Ly Thuong Kiet, Ward 14, District 10, HCMC, Vietnam

Vietnam National University - Ho Chi Minh City (VNU-HCM), Linh Trung Ward, Thu Duc District, HCMC, Vietnam

Email: hcanh@hcmut.edu.vn

History

- Received: 23-3-2020
- Accepted: 12-12-2020
- Published: 31-12-2020

DOI : 10.32508/stdjet.v3i4.692



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

In these recent years, natural compound industry has been more and more attractive many interested. Although *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják has been applied in Eastern medicine for long time, it has not researched deeply the chemical compounds and biological activities. In the experience, the presence of the polyphenol, flavonoid and alkaloid compounds with the value $IC_{50} = 127,99 \mu\text{g/mL}$ proved that this plant owns potential anti-tyrosinase activity. To expand its using in the pharmaceutical and cosmetics industries, optimize the extraction conditions for tyrosinase inhibition from *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják leaves using response surface methodology (RSM). The effect of the factors including ethanol concentration, temperature, solid/liquid ratio and extraction time on extraction of tyrosinase enzyme inhibitor from the *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják leaves was investigated by experimental and Response Surface Methodology (RSM) methods. Results demonstrated that the mathematical modeling are compatible with experimental data and all four factors exhibit significant effect on tyrosinase inhibition activity of the extract ($p < 0,05$). The optimal extraction conditions conjectured by the mathematical modeling as the content of solvent of 63% ethanol, the extraction temperature of $56.5 \text{ }^\circ\text{C}$, the solid / liquid ratio 1: 8.18 g/mL, and the extraction time of 13.96 minutes. Under these conditions, the extract indicated that the best tyrosinase inhibition value of the extract for IC_{50} was $56,39 \mu\text{g/mL}$, 2.5 times lower than the preliminary experiment value ($127,99 \mu\text{g/mL}$). Additionally, the experiment results of tyrosinase inhibition activity of optimal extraction showed that the results exported from mathematical modeling was equivalent with them.

Key words: anti-tyrosinase, *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják, optimize, preliminary, Response Surface Methodology

Cite this article : Xuan V T A, Tan L M, Anh H C. Optimization of anti-tyrosinase activity in extraction of *Persicaria pulchra* (Bl.) Soják by using Response Surface Methodology (RSM). *Sci. Tech. Dev. J. – Engineering and Technology*; 3(4):558-568.