



## Phát triển sản phẩm trắng da chống nám từ nguồn nguyên liệu thiên nhiên Việt Nam

Vũ Đức Lợi\*, Lê Thị Thu Hương, Bùi Thanh Tùng, Bùi Thị Xuân

Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 07 tháng 9 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 01 tháng 11 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2018

**Tóm tắt:** Qua tổng hợp dữ liệu và sàng lọc *insilico* đề tài đã xác định được 21 hợp chất tiềm năng ức chế enzym tyrosinase. Đề tài xác định được liệu có chứa nhóm chất có tiềm năng ức chế enzym tyrosinase và được dùng làm trắng da. Đó là lá cây dâu tằm. Từ lá dâu tằm, đề tài đã chiết xuất, phân lập được các phân đoạn dịch chiết và 11 hợp chất nhóm flavonoid, terpenoid là: Acid 3,4-dihydroxybenzoic, Acid ellagic, Acid gallic, Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, isofraxidin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, ( $\pm$ )-3,5,6,7,8,4'-hexahydroxyflavan, Kaempferol-3,7-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavan, (S)-5,5',7-trihydroxy-2',4'-dimethoxy-6-methylflavanon. Đề tài đã đánh giá độc tính cấp, tác dụng làm trắng da trên *invitro* và *invivo* với phân đoạn dịch chiết và hợp chất phân lập được. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết có độ an toàn cao, phân đoạn dịch chiết và hợp chất phân lập được có tác dụng làm trắng da tốt. Đề tài đã xây dựng công thức sản phẩm và bào chế sản phẩm dạng viên nang cứng và dạng kem bôi ngoài da, sau đó đánh giá tác dụng làm trắng da và tính kích ứng da của sản phẩm. Kết quả cho thấy 2 sản phẩm có độ an toàn cao, không gây kích ứng và có tác dụng làm trắng da tốt. Với kết quả này đề tài đã phối hợp với các công ty để đăng ký sản phẩm thực phẩm chức năng viên nang trắng da Morus và mỹ phẩm dạng kem MELAGENN.

**Từ khóa:** Morus, flavonoid, terpenoid, tyrosinase, lá dâu tằm.

### 1. Đặt vấn đề

Các sản phẩm làm trắng da, chống nám đang được lưu hành có nhiều vấn đề liên quan đến độ an toàn và hiệu quả. Vì thế quá trình tìm kiếm các thuốc mới là cần thiết. Ở Việt Nam hiện nay, việc nghiên cứu và phát triển một sản phẩm mới hầu hết dựa vào kinh nghiệm và y

học cổ truyền. Quá trình nghiên cứu tác dụng sinh học còn ít, nhất là với các sản phẩm mỹ phẩm. Mặt khác, Việt nam có tiềm năng rất lớn các sản phẩm từ tự nhiên.

Cây dâu tằm (*Morus alba* L.) trong sách cổ của Trung Quốc được coi là loài cây quý, bởi nó có rất nhiều công dụng đối với con người, vừa có thể làm thuốc trị bệnh, vừa có thể làm thực phẩm bồi bổ cơ thể. Trong đó, lá dâu tằm không chỉ được dùng để chữa các bệnh như tiểu đường, huyết áp cao, rối loạn lipid máu, viêm đường hô hấp, nhức đầu, mờ mắt.....mà còn

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-0917879959

Email: [ducloi82@gmail.com](mailto:ducloi82@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4103>

được dùng với công dụng làm đẹp da, trắng da [1-3]. Ngày nay, cùng với sự phát triển của xã hội, nhu cầu làm đẹp của con người tăng lên, đồng thời con người ngày càng có xu hướng quay về với tự nhiên để tìm kiếm giải pháp làm đẹp an toàn, hiệu quả. Lá dâu được coi là một trong những nguồn nguyên liệu tự nhiên quý trong việc làm đẹp da, loại bỏ vết thâm nám, tàn nhang trên da. Trên thế giới nghiên cứu về lá dâu cho thấy trong nó có các nhóm chất flavonoid, terpenoid, acid béo ... và có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, trắng da do ức chế enzyme tyrosinase [4-6]. Cho đến nay, các công trình nghiên cứu đã công bố về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của lá cây dâu ở Việt Nam còn ít. Để góp phần cung cấp những cơ sở tiền đề cho việc ứng dụng nguyên liệu lá dâu trong chăm sóc sức khỏe nói chung, cũng như xây dựng cơ sở khoa học để bào chế một số sản phẩm từ cao chiết lá dâu tằm, nghiên cứu về lá dâu tằm đã được thực hiện.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Xây dựng được cơ sở dữ liệu và sàng lọc được các hợp chất ức chế enzyme tyrosinase mạnh có nguồn gốc tự nhiên Việt nam [7]

Xây dựng cơ sở dữ liệu cấu trúc các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên Việt Nam: Các hợp chất được tập hợp từ các bài báo đăng trên các tạp chí quốc gia (Dược liệu, Dược học, Hóa học và Khoa học công nghệ..) và quốc tế.

Xác định các hợp chất có tác dụng ức chế mạnh enzyme tyrosinase bằng phương pháp sàng lọc ảo: Hệ thống sàng lọc ảo được xây dựng trong nghiên cứu sẽ được sử dụng để phát hiện các hợp chất có khả năng ức chế mạnh tyrosinase từ thông tin cấu trúc phân tử của các hợp chất đã được thu thập ở trên

### 2.2. Chiết xuất phân đoạn dịch chiết và phân lập hợp chất được dự đoán là có tác dụng ức chế tyrosinase [8, 9]

+ Chiết xuất phân đoạn dịch chiết chứa chất được dự đoán là có tác dụng ức chế tyrosinase:

- Xác định nguồn dược liệu Việt nam chứa hàm lượng lớn các hợp chất phát hiện được từ các nghiên cứu sàng lọc ảo: Nguồn dược liệu được xác định theo các tài liệu tham khảo và dựa trên số liệu về các hợp chất, nhóm hợp chất đã sàng lọc ở trên.

- Chọn mẫu dược liệu tương ứng có nhóm chất dự kiến cần phân lập.

- Chiết lấy cao toàn phần bằng phương pháp chiết xuất phân lập thường quy.

- Chiết tách các phân đoạn và đánh giá tác dụng ức chế tyrosinase trên *invitro* để chọn ra phân đoạn có tác dụng ức chế tyrosinase mạnh để phân tích thành phần hóa học.

+ Phân lập các hợp chất có tiềm năng ức chế tyrosinase từ các phân đoạn dịch chiết được chứng minh tác dụng ức chế tyrosinase.

- Từ phân đoạn ức chế tyrosinase đã được chọn ra ở trên, sử dụng các phương pháp sắc ký (sắc ký cột, sắc ký điều chế, sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao...) để tách các phân đoạn dịch chiết chứa nhóm chất được dự đoán là có khả năng ức chế tyrosinase.

+ Đánh giá độc tính của phân đoạn dịch chiết, chất tinh khiết phân lập bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon, cách tiến hành như sau:

+ Trước khi tiến hành thí nghiệm, để chuột nhịn ăn qua đêm.

+ Chuột được chia thành các lô khác nhau (mỗi lô 10 chuột). Cho chuột uống mẫu nghiên cứu với liều tăng dần trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 100 % chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (gây chết 0% chuột).

+ Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD<sub>50</sub> của thuốc thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc.

### 2.3. Đánh giá tác dụng làm trắng da

+ Đánh giá tác dụng ức chế enzym tyrosinase của các phân đoạn dịch chiết chứa hợp chất được dự đoán khả năng ức chế tyrosinase trên mô hình *in vitro* [10-12].

- Các phân đoạn dịch chiết sẽ được thử tác dụng ức chế tyrosinase *in vitro*. Nghiên cứu này sẽ sử dụng tyrosinase của nấm mốc (*Agaricus bisporus*) được phân lập. Đây là một thí nghiệm tương đối đơn giản, nhưng cho phép xác định nhanh tác dụng ức chế, khả năng ức chế cũng như động học của quá trình ức chế. Đồng thời, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự tương đồng trong cấu trúc giữa tyrosinase của *Agaricus bisporus* và của người.

- Phân đoạn có tác dụng mạnh sẽ tiến hành phân lập xác định một số hợp chất chính, sau đó đánh giá tác dụng ức chế tyrosinase trên *invitro* của hợp chất này.

+ Thử tác dụng ức chế enzym tyrosinase trên mô hình *in vivo* của một số hợp chất ức chế *in vitro* mạnh sự hình thành melanin [13, 14].

### 2.4. Xây dựng công thức và bào chế sản phẩm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm có tác dụng làm trắng da

Bào chế sản phẩm thực phẩm chức năng và mỹ phẩm: Xây dựng công thức, tiến hành khảo sát và bào chế sản phẩm. Xây dựng tiêu chuẩn của sản phẩm [15].

### 2.5. Đánh giá tác dụng làm trắng da và tính kích ứng của sản phẩm vừa được bào chế

+ Đánh giá tác dụng làm trắng của sản phẩm vừa được bào chế: Sử dụng phương pháp và kỹ thuật như đối với phân đoạn dịch chiết để đánh giá tác dụng của sản phẩm vừa được bào chế trên mô hình *invivo*.

+ Đánh giá tính kích ứng da của các sản phẩm vừa bào chế được: thông qua đánh giá độ nhạy cảm với da và độc tính với da [15].

### 2.6. Xử lý số liệu thống kê

Tất cả các dữ liệu đã thu được trong nghiên cứu này là giá trị trung bình của các thí nghiệm

đã được thực hiện ít nhất trong ba lần và được thể hiện như là SD  $\pm$  E phân tích thống kê được thực hiện bằng cách kiểm tra Student's test. Giá trị của p < 0,05 hoặc p < 0,001 được coi là có ý nghĩa thống kê.

## 3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả xây dựng cơ sở dữ liệu và sàng lọc các hợp chất ức chế enzym tyrosinase mạnh có nguồn gốc tự nhiên Việt Nam

Qua quá trình thu thập từ hơn 900 số báo ở các tạp chí trong nước và các tạp chí quốc tế, nghiên cứu lựa chọn được 424 báo cáo về phân lập các hợp chất hóa học từ dược liệu Việt Nam. Tiến hành thống kê có được 1751 hợp chất. Tất cả 1751 hợp chất được biểu diễn lại dưới định dạng 2D sử dụng phần mềm ChemBioOffice. Từ đây thu được các thông tin về biểu diễn dòng của hợp chất đó: SMILES, InChi, InChiKey. Những thông tin sau khi được phân tích và xử lý, được tập hợp và thống kê lại trên Excel, sau đó tiến hành lọc các hợp chất trùng nhau, nghiên cứu thu được 1376 hợp chất không trùng lặp từ 311 loài thực vật và nấm thuộc 114 họ thực vật có tại Việt Nam. Mỗi trường hợp chất chứa thông tin không lặp lại của các cấu trúc đã được tiêu chuẩn hóa và xác thực. Một hợp chất có thể được chiết xuất từ nhiều nguồn dược liệu và kèm theo đó là các tài liệu tham khảo liên quan.

Cơ sở dữ liệu (CSDL) sau khi được hoàn thiện hiện có 1376 hợp chất với thông tin về số đăng ký tên hợp chất VNPD\_ID từ 1 đến 1376; tên thông thường; tên quốc tế IUPAC; định dạng biểu diễn dòng (SMILES, InChi, InChiKey); phân loại nhóm cấu trúc; thông tin về các thông số lý hóa của hợp chất (khối lượng phân tử, AlogP, XlogP, Số liên kết cho Hydrogen, Số liên kết nhận Hydrogen, Số vi phạm quy tắc Số 5 của Lipinski, Rotatable Bonds Count, Charged Partial Surface Areas và MACCS trong Fingerprints); thông tin về nguồn dược liệu (tên nguồn dược liệu, tên khoa học, họ thực vật, địa điểm thu mẫu, thời gian thu mẫu, bộ phận dùng, tác dụng dân gian, tác dụng dược lý

được chứng minh); tài liệu tham khảo. Từ 1376 hợp chất này trải qua quá trình sàng lọc *insilico* thu được kết quả 21 hợp chất có tiềm năng ức chế enzym tyrosinase. Kết quả này được công bố trong bài báo: "Sàng lọc hợp chất có tác dụng ức chế enzym tyrosinase bằng phương pháp *in silico - in vitro*", *Tạp chí khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, tập 33, số 1, trang 12-18.

### 3.2. Chiết xuất phân đoạn dịch chiết và phân lập hợp chất được dự đoán là có tác dụng ức chế tyrosinase

Qua tham khảo một số dược liệu có tác dụng làm trắng da, đồng thời căn cứ vào nhóm hợp chất được sàng lọc có tác dụng làm sáng da và nhóm hợp chất có trong dược liệu, nguồn dược liệu sẵn có, có khả năng sử dụng trong quy mô sản xuất công nghiệp, chúng tôi quyết định lựa chọn lá dâu tằm để nghiên cứu tiếp về chiết xuất phân lập các hợp chất.

Lá dâu (lá bánh tẻ, thu hái với cây từ 2 năm tuổi trở lên tại Thái Nguyên) được thu hái, rửa sạch, phơi và sấy khô ở 50°C, nghiền nhỏ thu được bột thô. Lấy 6,0kg bột khô (đã trừ độ ẩm) đem ngâm chiết với 9,0 lít methanol/lần x 4 lần ở nhiệt độ phòng, mỗi lần 48 giờ. Các dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 520g cồn chiết methanol. Cồn chiết được phân bố vào nước cất vừa đủ và tiến hành chiết lần lượt với n-hexan, ethylacetat. Các dịch chiết n-hexan, ethylacetat và phần nước còn lại được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cồn n-hexan (A, 60 g), cồn ethylacetat (B, 75 g) và cồn nước (C, 42 g).

Cồn chiết n-hexan (A, 40g) được phân tách trên cột sắc ký silicagel pha thường (Merck), rửa giải gradient bằng hệ dung môi n-hexan/methanol theo tỷ lệ tăng dần MeOH (từ 90 : 10-10 : 90, v/v) thu được 4 phân đoạn là: A1 (7,2 g), A2 (6,9 g), A3 (4,2 g), A4 (9,1 g). Phân đoạn A2 được phân tách trên cột silicagel với hệ dung môi n-hexan/ethyl acetat (9/1, v/v) thu được 3 phân đoạn ký hiệu từ A2.1 (1,1g), A2.2 (1,3 g), A2.3 (1,6 g). Từ phân đoạn A2.1 kết

trình trong hệ dung môi  $\text{CHCl}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  (7/3, v/v) thu được 18 mg hợp chất **LA1**. Phân đoạn A2.2 được tiến hành sắc ký cột silicagel với hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (90/9/1, v/v/v) thu được 52mg hợp chất **LA2**. Phân đoạn A2.3 được tiến hành sắc ký cột silicagel với hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (8/2, v/v) thu được 10mg hợp chất **LA3**.

Cồn ethylacetat (B, 50 g) được hòa tan trong lượng dung môi vừa đủ và trộn với silicagel (150g), sau đó cất loại dung môi để được dạng bột tơi, tiến hành sắc ký cột với chất hấp phụ silicagel, kích thước cột 60cm x 10 cm (chiều dài x đường kính cột), dung môi rửa giải dicloromethan : methanol với độ phân cực của dung môi tăng dần (từ 20 : 1 đến 0 : 1) thu được 4 phân đoạn **B1** (6,0 g), **B2** (7,5g), **B3** (12,0g) và **B4** (10,0g). Phân tách phân đoạn **B3** trên sắc ký cột với chất hấp phụ pha đảo (ODS) sử dụng YMC-gel, kích thước cột 80 cm x 3 cm (chiều dài chất nhồi 70cm) và kích thước cột 80 cm x 1,5 cm (chiều dài chất nhồi 70 cm), sử dụng hệ dung môi rửa giải aceton: nước (2:5, v:v) thu được 4 phân đoạn nhỏ là: B3.1 (2,1 g), B3.2 (3,1 g), B3.3 (1,9 g), B3.4 (3,6 g).

Phân đoạn B3.1 được tinh chế bằng cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1) thu được chất rắn màu vàng ký hiệu là hợp chất **DB2** (41mg). Phân đoạn B3.2 được phân tách bằng sắc ký cột silicagel pha thường rửa giải bằng hệ dung môi chloroform/methanol (5/2, v/v) thu được hợp chất **DB1** (48mg). Từ phân đoạn B3.3 tiến hành sắc ký cột silicagel với hệ dung môi  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  (5/2, v/v) thu được 26 mg hợp chất **DB3**. Từ phân đoạn B3.4 tiến hành chạy qua cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi methanol : nước (2:1, v/v) thu được các hợp chất **DB4** (19mg).

Cồn nước (C, 30g) được hòa tan với lượng nước vừa đủ, sau đó chạy qua cột trao đổi ion sử dụng chất hấp phụ DiaionHP-20, kích thước cột 60cm x 5 cm (chiều dài chất nhồi khoảng 40cm), với hệ dung môi rửa giải nước : methanol thay đổi từ tỷ lệ 4:1 đến 1:1, kiểm tra các ống hứng dịch rửa giải bằng SKLM, gộp các ống có cùng thành phần, bốc hơi dung môi

thu được các phân đoạn **C1** (5,5g), **C2**(7,6g) và **C3** (9,5g).

Tinh chế phân đoạn **C3** trên sắc ký cột với chất hấp phụ pha đảo (ODS) sử dụng YMC-gel, kích thước cột 80 cm x 3 cm (chiều dài chất nhồi 70 cm) với hệ dung môi rửa giải methanol: nước (2:1, v:v) thu được 3 phân đoạn nhỏ là: C3.1 (1,2g), C3.2 (1,6g), C3.3 (1,4g). Phân đoạn C3.1 triển khai trên sắc ký cột với chất hấp phụ pha đảo (ODS) sử dụng YMC-gel, kích thước cột 80 cm x 1,5 cm (chiều dài chất nhồi 70 cm), hệ dung môi rửa giải aceton: nước (3:5, v:v) thu được hợp chất **LC1** (30mg). Phân đoạn C3.2 được chạy qua cột silicagel với hệ dung môi *n*-hexane : acetone (5:1, v/v) thu được chất **LC2** (21mg). Phân đoạn C3.1 tiếp tục được tinh chế qua cột sắc ký pha đảo YMC-RP-18 với hệ dung môi aceton: nước (1:1, v/v) thu được hợp chất **LC3** (19mg).

Căn cứ vào dữ liệu phổ NMR, IR, ESI-MS và góc quay cực, nhiệt độ nóng chảy...cùng với việc so sánh dữ liệu phổ của các hợp chất liên quan đã được công bố, đề tài đã xác định được cấu trúc của các hợp chất như sau:

Hợp chất LA1: Acid 3,4-dihydroxybenzoic

Hợp chất LA2: Acid ellagic

Hợp chất LA3: Acid gallic

Hợp chất DB1: Kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid

Hợp chất DB2: Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid

Hợp chất DB3: isofraxidin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Hợp chất DB4: ( $\pm$ )-3,5,6,7,8,4'-hexahydroxyflavan.

Hợp chất LC1: Kaempferitrin.

Hợp chất LC2: 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavon.

Hợp chất LC3: (S)-5,5',7-trihydroxy-2',4'-dimethoxy-6-methylflavanon.

Cấu trúc của các hợp chất trên được công bố trong các bài báo: "Chemical Constituents and Tyrosinase Inhibitory Activity of Aqueous Fraction of the Leaves of *Morus alba* L. from Vietnam", International Journal of Pharmacognosy, 2018; Vol. 5(7): 100-06. "Chemical Constituents and Tyrosinase Inhibitory Activity of Ethyl Acetate Extract of the Leaves of *Morus alba* L. from Vietnam", Research & Reviews: A Journal of Pharmacology, Volume 8, Issue 1, pp. 21-26.

### 3.3. Đánh giá độc tính cấp của dịch chiết, phân đoạn dịch chiết/chất tinh khiết phân lập được

Kết quả đánh giá độc tính cấp của các phân đoạn dịch chiết lá dâu

**Mẫu nghiên cứu:** cao chiết toàn phần, các phân đoạn *n*-hexan, ethylacetat, nước

Kết quả thử độc tính cấp được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Số liệu thử độc tính cấp của dịch chiết từ lá cây dâu

STT	n	Liều thử cao toàn phần (g/kg)	Liều thử PD <i>n</i> -hexan(g/kg)	Liều thử PD ethylacetat (g/kg)	Liều thử PD nước (g/kg)	Tỷ lệ chuột chết ở mỗi lô (%)
1	10	6	6	6	6	0
2	10	7	7	7	7	0
3	10	8	8	8	8	0
4	10	9	9	9	9	0
5	10	10	10	10	10	0
6	10	12	12	12	12	0

Kết quả bảng 1 cho thấy:

Khi cho chuột nhắt trắng uống các mẫu thử với liều 6 g -12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột, một lần/ngày, theo dõi trong 3 ngày, chuột vẫn khỏe mạnh, ăn uống, bài tiết, vận động bình thường, không có chuột nào chết.

Liều 12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột là liều tối đa có thể cho mỗi con chuột nhắt uống một lần trong một ngày mà chuột vẫn không có biểu hiện bất thường. Như vậy, xác định được LD<sub>0</sub> của các mẫu thử là 12 g mẫu thử/kg thể trọng chuột. Kết quả cho thấy các mẫu thử có độ an toàn cao.

### 3.4. Đánh giá tác dụng làm trắng da

3.4.1. Thử tác dụng ức chế enzyme tyrosinase của các phân đoạn dịch chiết chứa hợp chất được dự đoán khả năng ức chế tyrosinase trên *in vitro*

Kết quả nghiên cứu các phân đoạn dịch chiết lá dâu và các hợp chất phân lập được từ các phân đoạn này, được trình bày ở bảng 2.

Kết quả các phân đoạn dịch chiết từ cồn n-hexan, etyl acetate và cồn nước của cao methanol lá dâu và của các hợp chất phân lập được từ lá dâu ức chế enzyme tyrosinase được

trình bày trong bảng 1,2,3, 5 ,6 ,7. Kết quả ức chế enzyme tyrosinase được thể hiện qua giá trị IC<sub>50</sub>. Theo kết quả trên thì phân đoạn B3 có khả năng ức chế cao nhất so với các phân đoạn khác, tiếp theo đó là phân đoạn C3. Các phân đoạn B1; B2; C1; C2 A1; A2; A3 và A4 thấp hơn B3 và C3. Tác dụng ức chế enzyme tyrosinase kém nhất là phân đoạn A4. Hợp chất DB4 có khả năng ức chế cao nhất so với các hợp chất khác, tiếp theo đó là hợp chất LC3. Hợp chất DB1 cũng có tác dụng ức chế enzyme tyrosinase khá mạnh với IC<sub>50</sub> bằng 19,49 ± 2,83 µg/mL. Tác dụng ức chế enzyme tyrosinase kém nhất là hợp chất LA1. Kết quả chi tiết về tác dụng ức chế enzym tyrosinase của các phân đoạn dịch chiết và các hợp chất phân lập được đã công bố trong các bài báo: “Chemical Constituents and Tyrosinase Inhibitory Activity of Aqueous Fraction of the Leaves of *Morus alba* L. from Vietnam”, *International Journal of Pharmacognosy*, 2018; Vol. 5(7): 100-06. “Chemical Constituents and Tyrosinase Inhibitory Activity of Ethyl Acetate Extract of the Leaves of *Morus alba* L. from Vietnam”, *Research & Reviews: A Journal of Pharmacology*, Volume 8, Issue 1, pp. 21-26

Bảng 2. Giá trị IC<sub>50</sub> thể hiện tác dụng trăm ức chế enzyme tyrosinase của các phân đoạn A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2 và C3.

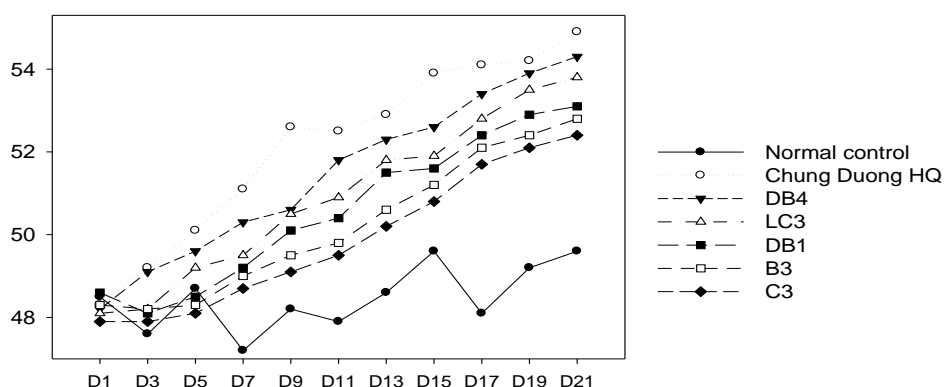
Phân đoạn	LogIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Hợp chất	LogIC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Acid kojic	0,81	6,45 ± 0,42	LA1	2,19	154,88 ± 2,17
A1	2,23	169,82 ± 5,83	LA2	1,87	74,13 ± 3,12
A2	2,28	190,54 ± 6,61	LA3	2,01	102,32 ± 5,93
A3	2,16	144,44 ± 4,42	DB1	1,29	19,49 ± 2,83
A4	2,35	223,87 ± 6,21	DB2	1,81	64,56 ± 2,42
B1	2,06	114,81 ± 4,54	DB3	1,83	67,61 ± 2,83
B2	2,11	128,8 ± 5,25	DB4	1,08	12,02 ± 2,63
B3	1,43	26,92 ± 3,76	LC1	1,85	70,79 ± 4,58
B4	2,21	162,18 ± 4,57	LC2	1,67	46,77 ± 3,51
C1	2,05	112,20 ± 4,18	LC3	1,19	15,48 ± 2,96
C2	2,09	123,02 ± 6,69			
C3	1,49	30,91 ± 2,98			

### 3.4.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng ức chế enzym tyrosinase trên *in vivo*

#### 3.4.2.1. Kết quả về tác dụng làm trắng da theo đường bôi ngoài da trên *in vivo* của các phân đoạn và các hợp chất có tác dụng tốt trên *in vitro*

Kết quả về khả năng khả năng loại bỏ sắc tố da *in vivo* được trình bày trong hình 1. Trong nghiên cứu *in vivo* này, chúng tôi đã sử dụng chứng dương là hydroquinone (HQ) vì đây là tác nhân đang được sử dụng rộng rãi nhất trong các liệu pháp làm trắng da trên thế giới. Trong vòng một tuần điều trị, độ trắng da đã tăng lên đáng kể ở những con chuột được điều trị bằng HQ, DB4, LC3 so với nhóm chứng âm. Sau

tuần đầu tiên, sự gia tăng còn bắt đầu trên cả các mẫu DB 1, B3, C3 và kéo dài cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Theo đó, chỉ số trắng da L của các mẫu thử nhỏ hơn chứng dương và hầu hết đều lớn hơn chứng âm tại cùng thời gian đo và các giá trị L đều tăng theo thời gian. Trong đó, giá trị đo được vào ngày thứ 21, khi kết thúc thí nghiệm, chỉ số L của mẫu DB 4 là cao nhất (54,3), sau đó là mẫu LC 3 (53,8). Chỉ số L của mẫu C 3 là thấp nhất (52,2) trong các mẫu nghiên cứu. Kết quả này cho thấy khả năng loại bỏ sắc tố da của mẫu DB 4, LC3 tuy kém nhóm chứng dương HQ nhưng vẫn tốt hơn các mẫu còn lại và mẫu C 3 thấp nhất nhưng vẫn có giá trị cao hơn nhiều nhóm chứng âm.



Hình 1. Chỉ số trắng da (L) theo thời gian của chuột được đánh giá trên các mẫu thử phân đoạn dịch chiết.

Đề tài đánh giá khả năng loại bỏ sắc tố trên *in vivo*. Trong thí nghiệm này, chuột được bôi các gel chứa các mẫu DB 4, LC3, DB1, B3, C3 khuếch tán trong Vaseline và đối chiếu với nhóm chứng âm chỉ được bôi Vaseline và nhóm chứng dương được bôi HQ 2% trong Vaseline. Những nhóm chuột được cạo lông và theo dõi chỉ số trắng da bằng máy Chromameter CR 2300d để làm tăng độ chính xác của kết quả thí nghiệm. Kết quả chỉ ra rằng, các mẫu DB 4, LC3, DB1, B3, C3 đều có khả năng loại bỏ sắc tố trên da khi so sánh với nhóm chứng âm. Tuy nhiên, chỉ số trắng da được ghi nhận ở các nhóm được bôi các mẫu DB 4, LC3, DB1, B3, C3 tại nồng độ sử dụng trong thí nghiệm thấp

hơn chỉ số trắng da của nhóm chứng dương tại cùng thời điểm tương ứng, nhưng không có khác biệt về ý nghĩa thống kê.

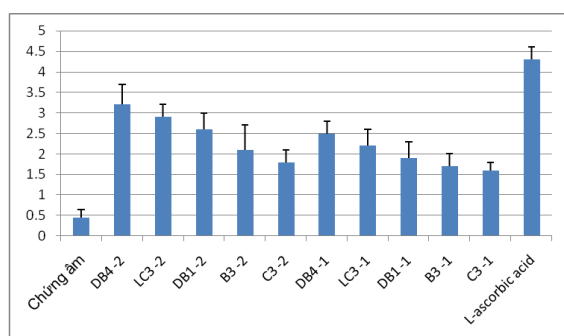
#### 3.4.2.2. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế enzym tyrosinase trên *in vivo* theo đường uống của các phân đoạn và các hợp chất có tác dụng tốt trên *in vitro*

Ảnh hưởng của các loại phân đoạn B 3, C3 và hợp chất DB 4, LC3, DB1 tới sự tổng hợp p melanin thể hiện ở bảng 3. Hình 2 thể hiện giá trị Delta L của từng nhóm thử nghiệm so với hai nhóm chứng. Trong đó, giá trị Delta L của các mẫu thử DB 4, LC3, DB1, B3, C3 đều lớn hơn giá trị Delta L của chứng âm (0,45) và nhỏ

hơn giá trị của chứng dương (4,3). Trong các mẫu thử, nhóm uống DB 4 liều 200mg/kg/ngày cho kết quả Delta L cao nhất (3,2), gấp hơn 7 lần nhóm chứng âm và gấp khoảng 1,8 lần nhóm thấp nhất trong các mẫu thử ở nồng độ 200mg/kg/ngày, nhóm uống C3 200mg/kg/ngày (1,8). DB4 liều 100mg/kg/ngày cho kết quả Delta L cao nhất (2,5), gấp hơn 5,5 lần nhóm chứng âm và gấp khoảng 1,6 lần nhóm thấp nhất trong các mẫu thử ở nồng độ 100mg/kg/ngày, nhóm uống C3 100mg/kg/ngày (1,6). Sai số của mỗi nhóm không nhiều, hầu hết đều không quá 0,5, (trừ nhóm B3 có sai số bằng 0,6), thể hiện độ tương đồng cao giữa kết quả của các chuột trong từng nhóm.

Bảng 3. Giá trị Delta L của các mẫu thử

	Delta L	SEM
Chứng âm	0,45	0,2
DB4 -2	3,2	0,5
LC3 -2	2,9	0,3
DB1 -2	2,6	0,4
B3 -2	2,1	0,6
C3 -2	1,8	0,3
DB4 -1	2,5	0,3
LC3 -1	2,2	0,4
DB1 -1	1,9	0,4
B3 -1	1,7	0,3
C3 -1	1,6	0,2
L-ascorbic acid	4,3	0,3



Hình 2. Tác dụng của các mẫu thử dựa trên giá trị Delta L.

### 3.5. Bào chế sản phẩm

#### 3.5.1. Bào chế thực phẩm chức năng dạng viên nang

a, Thành phần mỗi viên nang chứa:

Cao chiết lá dâu	250 mg
L- Cystine	50 mg
Vitamin B3	6 mg
Hythiol	80 mg
Phụ liệu: tinh bột, magiesterat.vừa đủ	1 viên

b, Quy trình bào chế:

Cân nguyên liệu theo tỷ lệ trong công thức, trộn bột khô tạo khối đồng nhất. Dùng khối bột này để đóng vào nang cứng. Đóng lọ, dán nhãn.

#### 3.5.2. Bào chế mỹ phẩm dạng kem bôi

a, Công thức bào chế: Extraction morus alba (20g), Nước, tranexamic acid, Alpha-Arbutin, Kojic acid, Niacinamide, Ethyl Ascorbic acid, Hyaluronic acid, Collagen extract, Butylene Glycol, Parfum, PGE-40 Hydrogenated Castor Oil, Glycolic acid, Glycerin, Cyclotetra peptide-24 Aminocyclohexane Carboxylate vừa đủ 100 g.

b, Quy trình bào chế

Bào chế kem chứa cao chiết lá dâu bằng phương pháp nhũ hóa: phụ liệu và chất nhũ hóa thân dầu đun chảy, hòa tan với dược chất thân dầu. Phụ liệu và chất nhũ hóa thân nước ngâm trương nở và hòa tan cùng dược chất thân nước. Phối hợp pha dầu và pha nước, vừa phối hợp vừa khuấy nhẹ nhàng trong dụng cụ thích hợp. Tiếp tục khuấy trộn mạnh cho tới khi thu được sản phẩm kem đồng nhất.

### 3.6. Kết quả đánh giá tác dụng trắng da của sản phẩm vừa bào chế ở trên

#### 3.6.1. Tác dụng trắng da của sản phẩm viên nang cứng

Tác dụng của viên nang Morus theo đường uống tới sắc tố da trên chuột lang nâu dưới ảnh hưởng của tia UVB.

Tác dụng ức chế của viên nang Morus, L-ascorbic acid tới quá trình hình thành sắc tố đã



rõ ràng trên các tế bào sắc tố của chuột. Để làm rõ hơn, chúng tôi đã nghiên cứu tác dụng *in vivo* của từng loại dược chất trên hắc tố bào của chuột lang nâu. Nhóm chuột uống viên nang Morus với liều 1 viên/ngày, L-ascorbic acid được uống trung bình L-ascorbic acid 600mg/kg/ngày trong suốt giai đoạn thử nghiệm. Không quan sát thấy các phản ứng phụ trên các nhóm chuột thử nghiệm.

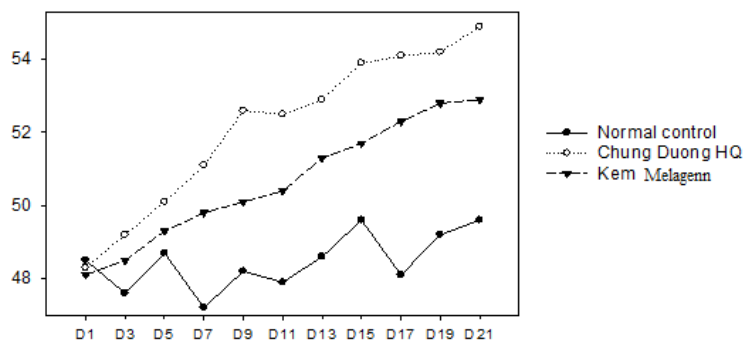
Mẫu	Delta L	SEM
Control (nước)	0,52	0,23
Viên nang Morus	3,9	0,7
L-ascorbic acid	4,3	0,5

Giá trị Delta L của nhóm uống viên nang Morus (3.9) lớn hơn giá trị Delta L của chứng âm (0.52) 7.5 lần và nhỏ hơn giá trị của chứng dương (4.3). Như vậy viên Morus có tác dụng tốt.

### 3.6.2. Tác dụng trắng da của sản phẩm mỹ phẩm dạng kem bôi

Kết quả về khả năng khả năng loại bỏ sắc tố da *in vivo* được trình bày trong hình 3. Trong

nghiên cứu *in vivo* này, chúng tôi đã sử dụng chứng dương là hydroquinone (HQ) vì đây là tác nhân đang được sử dụng rộng rãi nhất trong các liệu pháp làm trắng da trên thế giới. Trong vòng một tuần điều trị, độ trắng da đã tăng lên đáng kể ở những con chuột được điều trị bằng HQ và kem MELAGENN so với nhóm chứng âm và còn tiếp tục tăng trong thời gian sau. Theo đó, chỉ số trắng da L của kem MELAGENN nhỏ hơn chứng dương và lớn hơn chứng âm tại cùng thời gian đo. Trong đó, giá trị đo được vào ngày thứ 21, khi kết thúc thí nghiệm, chỉ số L của mẫu HQ là 54.8, cao hơn so với kem MELAGENN 52.3 (không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê), và chứng âm là 49.2 (có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê so với hai mẫu HQ và kem MELAGENN). Kết quả này cho thấy khả năng loại bỏ sắc tố da của mẫu kem MELAGENN tuy kém nhóm chứng dương HQ nhưng vẫn cao hơn nhiều so với nhóm chứng âm.



Hình 3. Chỉ số trắng da (L) theo thời gian của chuột khi dùng kem Melagenn.

Bảng 4. Bảng theo dõi chuột thí nghiệm thử độc tính cấp của viên nang Morus

Nhóm chuột	Liều dùng (g mẫu thử/ kg chuột)	Số chuột thí nghiệm	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
Nhóm chuột 1	4,0	10	0	0
Nhóm chuột 2	6,0	10	0	0
Nhóm chuột 3	8,0	10	0	0
Nhóm chuột 4	10,0	10	0	0
Nhóm chuột 5	12,0	10	0	0

### 3.7. Kết quả đánh giá độc tính của sản phẩm

#### 3.7.1. Độc tính của sản phẩm dạng viên nang cứng

Kết quả đánh giá độc tính của sản phẩm theo đường uống được trình bày ở bảng 4.

Thử nghiệm không xác định được LD<sub>50</sub> do mức liều tối đa có thể cho chuột uống được thì không thấy có chuột chết. Theo phân loại độc tính của GHS (Globally Harmonised System for Classification of Chemicals) những chất có giá trị độc tính cấp LD<sub>50</sub> trong khoảng > 5000 mg/kg thể trọng, được coi là chất gần như không độc. Vì vậy có thể kết luận viên nang Morus có độ an toàn cao.

#### 3.7.2. Độc tính của sản phẩm mỹ phẩm dạng kem bôi

Đánh giá độ nhạy cảm với da của mỹ phẩm: Thử nghiệm MEST được sử dụng cho thí nghiệm này vì nó nhạy cảm, hiệu quả và tiết kiệm chi phí cho thử nghiệm nhạy cảm da chuột lang. Nồng độ không gây kích ứng cao nhất trên tai và nồng độ kích thích nhẹ trên bụng là 20 mg/mL và 25 mg/mL. Phương pháp dò liều này giúp xác định tốt nồng độ tối đa không gây kích ứng trên tai, là nồng độ thử nghiệm trong nghiên cứu thực tế. Kết luận về ảnh hưởng độ kích ứng da được thực hiện dựa trên % sưng tai giữa tai thử nghiệm và tai đối chứng. Một phản ứng nhạy cảm dương tính được xem là đã xảy ra nếu tai kiểm tra của một hoặc nhiều con chuột có độ dày ít nhất 20% so với tai đối chứng (Teshome, Gebre-Mariam et al. 2010). Dựa trên tiêu chí này, không có kết quả xét nghiệm nào cho thấy tai thử nghiệm dày hơn 20% so với tai đối chứng cả ở giai đoạn thử nghiệm và thử lại, cho thấy Kem MELAGENN là chế phẩm không gây kích ứng.

## 4. Kết luận

Qua quá trình thu thập từ hơn 900 số báo ở các tạp chí trong nước và các tạp chí quốc tế, nghiên cứu lựa chọn được 424 báo cáo về phân lập các hợp chất hóa học từ dược liệu Việt

Nam. Tiến hành thống kê được 1751 hợp chất và bằng phương pháp insilico đã sàng lọc chọn ra được 21 hợp chất có tiềm năng ức chế enzym tyrosinase để làm trắng da.

Qua khảo sát, tìm kiếm thông tin về các dược liệu có tác dụng làm trắng da, và có chứa nhóm hợp chất tiềm năng ức chế enzym tyrosinase, đề tài đã xác định lựa chọn lá dâu, một loại dược liệu dễ trồng, sẵn có tại Việt Nam để tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu. Từ dược liệu lá dâu, đề tài đã chiết xuất phân lập được 11 hợp chất là: Acid 3,4-dihydroxybenzoic, Acid ellagic, Acid gallic, Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosid, Quercetin 3-O-α-L-rhamnopyranosid, isofraxidin-7-O-β-D-glucopyranosid, (±)-3,5,6,7,8,4'-hexahydroxyflavan, Kaempferol-3,7-di-O-α-L-rhamnopyranosid, 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavan, (S)-5,5',7-trihydroxy-2,4'-dimethoxy-6-methylflavanon. Đã đánh giá độc tính cấp của các dịch chiết, phân đoạn dịch chiết, kết quả cho thấy chúng có độ an toàn cao, ở liều 12g mẫu thử/kg thể trọng chuột khi cho chuột uống, không thấy có chuột chết. Đã đánh giá tác dụng trắng da, chống nám trên *invitro* và *invivo* đối với các phân đoạn dịch chiết và các chất phân lập được. Kết quả đánh giá trên *invitro* cho thấy, phân đoạn B3 và hợp chất DB4 có tác dụng tốt nhất với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là: 26,92 ± 3,76 μg/mL và 12,02 ± 2,63 μg/mL. Kết quả đánh giá trên *invivo* cũng cho kết quả tác dụng trắng da tốt, tương đồng với *invitro*.

Từ phân đoạn dịch chiết được đánh giá tác dụng, đề tài đã xây dựng công thức và quy trình bào chế viên nang cứng Morus và kem bôi MELAGENN. Sau đó đề tài đánh giá tác dụng của 2 sản phẩm này, kết quả cho thấy sản phẩm có tác dụng trắng da tốt. Đồng thời cũng đánh giá tính kích ứng da của kem bôi thông qua việc đánh giá độ nhạy cảm với da của sản phẩm và đánh giá độc tính của viên nang theo đường uống. Kết quả kem bôi không gây kích da và viên nang có độ an toàn cao. Từ kết quả nghiên cứu, đề tài đã đăng ký sản phẩm Thực phẩm chức năng viên nang trắng da Morus và mỹ phẩm MELAGENN.

## Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc Gia Hà Nội, đề tài “Phát triển sản phẩm trắng da chống nám từ nguồn nguyên liệu thiên nhiên Việt Nam”, mã số: QG.16.86.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thương Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Thu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2011), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập III, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 479-480.
- [2] Đỗ Tất Lợi (2005), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nxb Y học.
- [3] Viện Dược liệu (2004), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB Khoa học kỹ thuật, tr.462-468.
- [4] Chang, L.-W., et al., (2011), Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4): p. 785-790.
- [5] Du, Jiang, et al. (2003), "Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L." *Phytochemistry* 62.8, 1235-1238.
- [6] A. Varnek, et al., (2008) ISIDA - Platform for Virtual Screening Based on Fragment and Pharmacophoric Descriptors. *Current ComputerAided Drug Design* 4 191.
- [7] Baurin, N., et al., (2002), Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002. 82(2): p. 155-158.
- [8] Lan Jiang, Sodik Numonov, Khayrulla Bobakulov, Muhammad Nasimullah Qureshi Haiqing Zhao and Haji Akber Aisa, (2015), Phytochemical Profiling and Evaluation of Pharmacological Activities of *Hypericum scabrum* L., *Molecules* 20, 11257-11271
- [9] Chunpeng Wan, Yanying Yu, Shouran Zhou, Shuge Tian and Shuwen Cao (2011), Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves, *Pharmacogn Mag.* 7(26): 101–108.
- [10] Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 139-141.
- [11] Granata, A., et al., (2007), Tyrosinase-generated quinones induce covalent modification, unfolding, and aggregation of human holo-myoglobin. *Biomacromolecules*, 8(10): p. 3214-3223.
- [12] Kim, Y.-J. and H. Uyama, (2005), Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15): p. 1707-1723.
- [13] Kubo, I., I. Kinst-Hori, and Y. Yokokawa, (1994), "Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits." *Journal of Natural Products*, 57(4): p. 545-551.
- [14] Khan, S.B., et al., (2010), Tyrosinase inhibitory effect of benzoic acid derivatives and their structure-activity relationships. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(6): p. 812-817.
- [15] Bộ Y tế, (2009), Dược điển Việt Nam 4.

## Development of functional food product and skin bleaching cosmetics from Vietnamese natural sources.

Vu Duc Loi\*, Le Thi Thu Huong, Bui Thanh Tung, Bui Thi Xuan

VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

**Abstract:** Through data synthesis and screening the subject insilico identified 21 potential compounds inhibit tyrosinase enzyme. The subject identified the herbal containing group of substances that can inhibit tyrosinase enzymes and use to whiten skin. Those are leaves of *Morus alba*. From these leaves, we extracted, isolated fractions and 11 flavonoid, terpenoid compounds as: 3,4-dihydroxybenzoic acid, ellagic acid, gallic acid, Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside, Quercetin 3-

O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, isofraxidin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, ( $\pm$ ) -3,5,6,7,8,4'-hexahydroxyflavane, Kaempferol-3,7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, 7,4'-dihydroxy-5,3'-dimethoxyflavone, (S) -5,5', 7-trihydroxy-2', 4'-dimethoxy-6-methylflavanone. The subject evaluated for acute toxicity, skin whitening effects on invitro and invivo with extracted fractions and isolated compounds. The results showed that the high safety fractions, these fractions and compounds had good whitening effect. The subject created product recipes and manufacturing products with form of capsules and creams, then evaluate the skin whitening and skin irritancy of these products. The results showed that the two products have high safety, no irritation and good skin whitening effect. With these results, we collaborated with companies to register Morus capsules supplement food and MELAGENN cream cosmetics.

*Keywords:* *Morus alba*, tyrosinase, insilico, flavonoid, terpenoid.