

# Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của hạt vải và hạt nhãn

Nguyễn Thị Minh Hằng<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Tú Oanh<sup>1</sup>, Lê Nguyễn Thành<sup>1</sup>  
Trần Hữu Giáp<sup>1</sup>, Elena Spyridovich<sup>2</sup>, Châu Văn Minh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam

<sup>2</sup>Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

## Summary

The *n*-hexane, ethyl acetate and methanolic extracts from lychee (*Litchi chinensis* Lour.) and longan (*Dimocarpus longan* Sonn.) seed were evaluated antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and tyrosinase inhibitory activities. The ethyl acetate and methanolic extracts exhibited better activities than the *n*-hexane extracts. The ethyl acetate extract of longan seed (**DLE**) showed the best antimicrobial activities, which inhibited four of seven tested microorganism strain with MIC of 32 - 128  $\mu\text{g/mL}$ . The ethyl acetate of lychee seed (**LCE**) have the best DPPH radical scavenging activity with  $\text{IC}_{50}$  of  $15.74 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$ . The ethyl acetate and methanolic extracts of longan seed (**DLE** and **DLM**) inhibited tyrosinase enzyme with 52.17 and 67.83 % at the dose of 500  $\mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** *Litchi chinensis*, *Dimocarpus longan*, antimicrobial, antioxidant, tyrosinase.

## Đặt vấn đề

Vải và nhãn là các cây ăn quả quan trọng và đang đóng góp đáng kể vào kim ngạch xuất khẩu rau quả của Việt Nam trong những năm gần đây. Bên cạnh cách sử dụng quả vải và nhãn dưới dạng quả tươi thì chúng cũng được chế biến thành nhiều sản phẩm khác như vải khô, vải hộp, long nhãn là các mặt hàng xuất khẩu có giá trị cao. Các quá trình chế biến này sẽ tạo ra một nguồn phụ phẩm trong đó hạt chiếm khối lượng khá lớn.

Trong Y học cổ truyền, hạt vải gọi là lệ chi hạch có tác dụng chữa đau xoang dạ dày, đau sán khí, phụ nữ huyết khí thích thống. Hạt nhãn dùng trị đau dạ dày, đau thoát vị, mụn nhọt và bỏng, vết thương chảy máu [1]. Trên thế giới đặc biệt ở Trung Quốc, hạt vải và hạt nhãn đã được nghiên cứu nhiều về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học, chúng đã được chứng minh là nguồn giàu các hợp chất polyphenol, flavonoids, procyanidins, terpenoid với nhiều hoạt tính như điều trị tiêu đường, hạ mỡ máu,

chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch [2-5].

Ở Việt Nam, mặc dù nguồn nguyên liệu hạt vải và hạt nhãn khá lớn và chúng cũng được sử dụng trong Y học cổ truyền nhưng mới chỉ có một vài nghiên cứu về các loại hạt này [6-8]. Để tạo cơ sở khoa học cho việc định hướng nghiên cứu ứng dụng hạt vải và hạt nhãn của Việt Nam thành các sản phẩm có giá trị được phục vụ đời sống và tận dụng nguồn nguyên liệu sẵn có đang được coi là phụ phẩm của quá trình chế biến quả nhãn và quả vải tươi, chúng tôi đã tiến hành khảo sát một số hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, thu dọn gốc tự do DPPH, gây độc tế bào và ức chế enzym tyrosinase của các cao chiết được điều chế từ hạt vải và hạt nhãn.

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### Nguyên liệu thực vật

Mẫu quả vải được thu ở huyện Lục Ngạn, tỉnh Bắc Giang tháng 6 năm 2019. Mẫu quả nhãn được thu ở huyện Tiên Lữ, tỉnh Hưng Yên tháng 7 năm 2019. Quả thu về được bóc vỏ, bỏ cùi để thu lấy hạt, rửa sạch và phơi khô trong bóng râm, sấy ở nhiệt độ 50 °C đến khối lượng không đổi.

### Điều chế các cao chiết từ hạt vải

Hạt vải khô (1,5 kg) xay nhỏ được ngâm chiết với *n*-hexan ở nhiệt độ phòng trong vòng

---

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Minh Hằng

Email: minhhang@imbc.vast.vn

Ngày nhận: 01/7/2020

Ngày phản biện: 27/7/2020

Ngày duyệt bài: 29/10/2020

24 giờ (4 lần x 2 L/lần). Gom chung dịch chiết của các lần ngâm và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan (LCH, 90,6 g). Bã tiếp tục được ngâm với MeOH ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ (4 lần x 2 L/lần). Các dịch chiết MeOH được gộp chung và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 500 mL dịch cô đặc. Chiết phân bố dịch cô đặc này với ethyl acetat 3 lần, mỗi lần 500 ml dung môi. Dịch chiết ethyl acetat được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao ethyl acetat (DLE, 31,57 g). Dịch còn lại sau khi chiết được cất loại dung môi thu được cao methanol (LCM, 65,5 g) [9].

#### **Điều chế các cao chiết từ hạt nhân**

Hạt nhân khô (408 g) được xay nhỏ, ngâm chiết với *n*-hexan ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ (4 lần x 700 mL/lần). Gom chung dịch chiết của các lần ngâm và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được cao chiết *n*-hexan (DLH, 42,6 g). Bã tiếp tục được ngâm với MeOH ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ (4 lần x 500 mL/lần). Các dịch chiết MeOH được gộp chung và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu được 300 mL dịch cô đặc. Chiết phân bố dịch cô đặc này với ethyl acetat 3 lần, mỗi lần 500 ml dung môi. Dịch chiết ethyl acetat được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao ethyl acetat (DLE, 12,72 g). Dịch còn lại sau khi chiết được cất loại dung môi thu được cao methanol (DLM, 50,0 g).

#### **Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật [10]**

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện theo phương pháp pha loãng đa nồng độ. Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật và vi nấm của các mẫu thử thông qua các giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu). Mẫu ban đầu được pha loãng trong DMSO 50% ở dải nồng độ giảm dần: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 và 2 µg/mL với số thí nghiệm lặp lại N = 3.

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn hoặc vi nấm với mật độ  $2 \times 10^4$  CFU/mL. Thử nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng. Lấy 5,12 µL dung dịch mẫu thử có nồng độ 10 mg/mL vào hàng đầu tiên có chứa 100 µL môi trường LB rồi pha loãng liên tiếp giảm  $\frac{1}{2}$  nồng độ vào các hàng có chứa 50 µL cho đến khi đạt được nồng độ là 2 µg/mL, thêm 50 µL dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ  $2 \times 10^4$  CFU/mL, ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ

chất thử thấp nhất gây ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật bằng phương pháp đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và phần mềm Rawdata. Chất đối chứng là kháng sinh streptomycin cho các chủng vi khuẩn và cyclohexamid cho nấm.

#### **Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa [11]**

Hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện bằng phương pháp đánh giá khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH.

Pha dung dịch DPPH (Sigma-Aldrich) có nồng độ 300 µM trong methanol. Chất thử được pha trong DMSO 100% để đạt được một dãy các nồng độ 256; 64; 16; 4; 1 µg/mL.

Đĩa 96 giếng gồm:

Giếng phản ứng: Trộn mẫu 10 µL và 190 DPPH µL.

Giếng chứng: 10 µL DMSO 0,5 % và 190 DPPH µL.

Chất tham chiếu: quercetin được pha trong DMSO giống như với mẫu thử để đạt được dãy các nồng độ 32; 8; 2; 0,5 µg/mL.

Thời gian phản ứng 30 phút ở 37 °C, đọc mật độ hấp phụ của DPPH bằng máy quang phổ ở bước sóng 517 nm.

% bắt giữ gốc tự do DPPH của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$SC\% = (OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / OD_{\text{chứng}} (\%)$$

EC<sub>50</sub> (nồng độ chất thử bắt giữ hiệu quả gốc tự do) được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử.

#### **Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzym tyrosinase [12]**

Được thực hiện bằng bộ Kit Tyrosinase Inhibitor Screening Kit (Colorimetric) của Hãng Biovision theo hướng dẫn của Hãng.

Mẫu thử được pha trong DMSO. Tyrosinase được hòa tan trong dịch đệm và cơ chất của tyrosinase được hòa tan trong nước. 20 µL mẫu thử được ủ với 50 µL dung dịch tyrosinase ở 25°C trong 10 phút. Sau đó tiếp tục bổ sung 30 µL dung dịch cơ chất, ủ ở nhiệt độ phòng và đo trên máy ELISA ở bước sóng 510 nm sau 30 và 50 phút. Chất đối chứng kojic acid được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương.

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = [(Slope C - Slope S) / Slope C] * 100$$

- Slope C: được tính bằng giá trị OD510 của mẫu đối chứng tại thời điểm 50 phút – giá trị OD510 của mẫu đối chứng tại thời điểm 30 phút.

- Slope S: được tính bằng giá trị OD510 của mẫu thử tại thời điểm 50 phút – giá trị OD510 của mẫu thử tại thời điểm 30 phút.

#### Hoạt tính gây độc tế bào [13]

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) được mô tả lần đầu tiên bởi tác giả Tim Mosman, 1983. Đây là

phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể. Sản phẩm formazan được hòa tan bằng DMSO và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm. Hoạt tính được thể hiện thông qua giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào).

Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ Ức chế tế bào} = \frac{(OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / (OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%}{(High_{\text{Inh}\%} - 50) \times (High_{\text{Conc}} - Low_{\text{Conc}})}$$

$$IC_{50} = High_{\text{Conc}} - \frac{High_{\text{Inh}\%} - Low_{\text{Inh}\%}}{High_{\text{Inh}\%} - Low_{\text{Inh}\%}}$$

(Trong đó, High<sub>Conc</sub>/Low<sub>Conc</sub>: chất thử ở nồng độ cao/chất thử ở nồng độ thấp;  
High<sub>Inh%</sub>/Low<sub>Inh%</sub>: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Giá trị IC<sub>50</sub> ≤ 20 µg/ml (với dịch chiết thô) và IC<sub>50</sub> ≤ 4 µg/ml (với chất sạch) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào.

#### Kết quả

Bằng phương pháp ngâm chiết và chiết phân bố lỏng-lỏng, chúng tôi thu được các cao chiết *n*-hexan (**LCH**), ethyl acetat (**LCE**), methanol (**LCM**) từ hạt vải; và các cao chiết *n*-hexan (**DLH**), ethyl acetat (**DLE**) và methanol (**DLM**) từ hạt nhãn. Các cao chiết này được tiến hành nghiên cứu một số hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, chống ôxi hóa thông qua khả năng bất giữ gốc tự do DPPH, ức chế enzym tyrosinase và gây độc tế bào ung thư biểu mô KB.

#### Hoạt tính kháng vi sinh vật

Các cao chiết từ hạt vải và hạt nhãn bao gồm *n*-hexan (**LCH** và **DLH**), ethyl acetat (**LCE**

và **DLE**) và methanol (**LCM** và **DLM**) đã được đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trên 3 chủng vi khuẩn Gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC13124, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 13245), 3 chủng Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC12228), và 1 chủng nấm men (*Candida albicans* ATCC1023). Các vi sinh vật được thử nghiệm đều là các vi khuẩn và nấm gây bệnh thường gặp ở người. Kết quả (bảng 1) cho thấy tất cả các cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng đối với ít nhất một chủng vi sinh vật thử nghiệm trong đó cao chiết **LCH** và **DLE** có phổ hoạt tính rộng nhất kháng 4/7 chủng vi sinh vật thử nghiệm.

**Bảng 1. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định**

Mẫu	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)						
	Gram (+)			Gram (-)			Nấm men
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. ereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
LCH	32	256	256	-	-	-	256
LCE	16	128	256	-	-	-	-
LCM	16	-	-	-	-	-	-
DLH	64	-	-	-	-	-	-
DLE	32	64	128	-	-	-	128
DLM	64	-	-	-	-	-	256
Streptomycin	256	256	128	32	256	128	-
Cyclohexamid							32

### Hoạt tính bắt giữ gốc tự do DPPH

Các cao chiết này cũng được đánh giá khả năng chống oxy hóa thông qua khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH. Kết quả (bảng 2) cho thấy, các cao chiết ethyl acetat và methanol của cả hạt vải và hạt nhãn đều thể hiện hoạt tính bắt giữ gốc tự do DPPH trong đó cao chiết ethyl acetat của hạt vải (**LCE**) có hoạt tính tốt nhất với  $EC_{50}$  là  $15,74 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Các cao chiết *n*-hexan không thể hiện hoạt tính.

**Bảng 2.** Kết quả đánh giá hoạt tính quét gốc tự do DPPH

Tên mẫu	Giá trị $EC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
LCH	> 128
LCE	$15,74 \pm 0,22$
LCM	$81,82 \pm 2,0$
DLH	> 128
DLE	$61,66 \pm 1,34$
DLM	$33,88 \pm 2,07$
Quercetin	$8,63 \pm 0,1$

### Hoạt tính ức chế enzym tyrosinase

Các cao chiết từ hạt nhãn gồm *n*-hexan (**DLH**), ethyl acetat (**DLE**) và methanol (**DLM**) đã được đánh giá hoạt tính ức chế enzym tyrosinase. Kết quả được trình bày trong bảng 3 cho thấy cao **DLE** và **DLM** thể hiện hoạt tính. Cao **DLE** có tác dụng ức chế 52,17% và 40,87% độ hoạt động của enzym tyrosinase ở nồng độ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cao **DLM** ức chế 67,83% và 71,30% độ hoạt động của enzym tyrosinase ở nồng độ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  và 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Bảng 3.** Kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế hoạt tính tyrosinase

STT	Tên mẫu	Nồng độ thử ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% Inhibition
1	<b>DLH</b>	1000	-33,04
		500	-33,04
		100	1,74
2	<b>DLE</b>	1000	40,87
		500	52,17
		100	15,65
3	<b>DLM</b>	1000	71,30
		500	67,83
		100	9,57
	<i>Kojic acid</i>	15 $\mu\text{M}$	$29,40 \pm 0,16$

\* *acid kojic* được dùng làm chuẩn dương để đánh giá mức độ ổn định của phương pháp

### Hoạt tính gây độc tế bào

Tất cả các cao chiết từ hạt vải và hạt nhãn bước đầu được sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư biểu mô người KB. Tuy nhiên, không có cao chiết nào thể hiện hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào này.

### Bàn luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy một số cao chiết từ hạt vải và hạt nhãn có hoạt tính kháng vi sinh vật, chống ô-xi hóa và ức chế enzym tyrosinase. Mặc dù mới chỉ là các kết quả nghiên cứu sơ bộ nhưng là tín hiệu khả quan định hướng ứng dụng cho những nghiên cứu tiếp về hạt vải và hạt nhãn. Tuy nhiên, cần thiết phải tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các thành phần có trong các nguồn nguyên liệu này để có thể làm sáng tỏ nguồn gốc của các hoạt tính nêu trên. Đây là hướng nghiên cứu tiềm năng nhằm tận dụng nguồn nguyên liệu phế phẩm để tạo ra các chế phẩm giá trị có khả năng ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm như sản phẩm có khả năng chống ô-xi hóa, kháng khuẩn và làm trắng da.

### Kết luận

Cao chiết ethyl acetat và nước của hạt vải và hạt nhãn đều thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật và chống oxy hóa. Các cao chiết này của hạt nhãn còn thể hiện thêm hoạt tính ức chế enzym tyrosinase. Các hoạt tính này có thể liên quan đến sự có mặt của các thành phần polyphenol trong các cao chiết này như đã được công bố trước đây. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học từ hạt vải và hạt nhãn.

*Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài mã số QTBY01.06/19-20.*

### Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, tập 2, tr. 341-342, tr. 1141-1142.

2. Ibrahim, S. R., & Mohamed, G. A. (2015), "Litchi Chinensis: medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology", *Journal of Ethnopharmacology*, 174, pp. 492-513.
3. Lin, C. C., Chung, Y. C., & Hsu, C. P. (2012), "Potential roles of Longan flower and seed extracts for anti-cancer", *World J. of Experimental Medicine*, 2 (4), pp. 78-85.
4. Zheng, G., Xu, L., Wu, P., Xie, H., Jiang, Y., Chen, F., & Wei, X. (2009), "Polyphenols from Longan seeds and their radical-scavenging activity", *Food Chemistry*, 116 (2), pp. 433-436.
5. Sudjaroen, Y., Hull, W. E., Erben, G., Würtele, G., Changbumrung, S., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2012), "Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds", *Phytochemistry*, 77, pp. 226-237.
6. Phạm Thị Anh, Hồ thanh Nga, Nguyễn Mạnh Tuyển (2014), "Tác dụng chống oxi hóa và bảo vệ gan của hạt vải (Semen *Litchi*) trên thực nghiệm", *Tạp chí Dược học*, 475, tr. 22-25.
7. Bui Tran Nu Thanh Viet, Dang Thi To Uyen, Nguyen Hong Ngan, Phan Thi Phuong, Vo Thi Kim Lai (2016), "Extraction methods and antioxidant properties of polysaccharide from Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed", *International J. of Engineering Res. & Technology*, 5 (6), pp. 10-14.
8. Phạm Quốc Long, Đoàn Lan Phương, B. Matthaus, K. Aitzetmuller (2002), "Thành phần lipid trong dầu hạt thực vật họ Sapindaceae của Việt Nam", *Tạp chí Khoa học ĐHQG, KHTN&CN*, T. XVIII, số 4, tr. 28-36.
9. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ chí Minh 2007.
10. Franz Hadacek, Harald Greger (2000), "Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice", *Phytochemical Analysis*, 11 (3), pp. 137-147.
11. Kai Marxen, Klaus Heinrich Vanselow, Sebastian Lippemeier, Ralf Hintze, Andreas Ruser and Ulf-Peter Hansen (2007), "Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements", *Sensors*, 7, pp. 2080-2095.
12. Tyrosinase Inhibitor Screening Kit (Colorimetric), [www.biovision.com](http://www.biovision.com)
13. Tim Mosmann (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay", *J. of Immunological Methods*, 65, pp. 55-63.