

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN CHIẾT ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA CỦA DỊCH CHIẾT LÁ BẦU ĐẤT (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) TRỒNG TẠI KHÁNH HÒA

Phạm Thị Kim Quyên¹, Nguyễn Văn Minh², Nguyễn Thế Hân^{2*}

¹*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III*

²*Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang*

Email*: hannt@ntu.edu.vn

Ngày gửi bài: 18.03.2016

Ngày chấp nhận: 15.07.2016

TÓM TẮT

Lá bầu đất *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. là cây dược liệu được sử dụng phổ biến ở các nước Đông Nam Á trong việc điều trị các bệnh viêm nhiễm, mỡ máu, cao huyết áp và tiểu đường. Nghiên cứu này đánh giá sự ảnh hưởng của điều kiện chiết bao gồm: dung môi chiết, nồng độ dung môi chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết và phương pháp chiết (ngâm tĩnh và có sự hỗ trợ của sóng siêu âm), đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của lá bầu đất *Gynura procumbens* (Lour) Merr.). Phương pháp Folin - Ciocalteu's được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2' - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) và tổng năng lực khử được sử dụng để đánh giá khả năng chống oxy hóa. Điều kiện chiết thích hợp được xác định như sau: dung môi chiết 50% methanol, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết là 30 phút và sử dụng phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Dịch chiết thu được trong điều kiện thích hợp có hàm lượng polyphenol tổng số, khả năng bắt gốc tự do DPPH (EC₅₀) và tổng năng lực khử (EC₅₀) lần lượt là 48,49 mg GAE/g dịch chiết khô, 0,13 và 0,06 mg/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết từ lá bầu đất có tiềm năng sử dụng làm chất chống oxy hóa tự nhiên.

Từ khóa: Lá bầu đất *Gynura procumbens*, polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa, điều kiện chiết.

Effect of Extraction Conditions on Polyphenol Content and Antioxidant Activity of the Extract from *Gynura Procumbens* (Lour) Merr. Leaves

ABSTRACT

Gynura procumbens (Lour.) Merr. is a well - known traditional herb in South East Asia and it is widely used to treat inflammation, high cholesterol level, high blood pressure and diabetes. In the present study, the effects of various extraction conditions were investigated: solvent, solvent concentration, material to solvent ratio, extraction temperature, extraction time and extraction techniques (maceration and ultrasonic - assisted) on total phenolic content (TPC) and antioxidant activity of the extract from leaves of *Gynura procumbens* (Lour) Merr. cultivated in Khánh Hoa province. Folin - Ciocalteu's method was used for the determination of TPC, while the antioxidant activity was determined by 2,2' - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and reducing power assays. The best extraction conditions were as follows: 50% aqueous methanol as the extraction solvent, 1: 50 material to solvent ratio, the extraction temperature at 60°C and the extraction time of 30 min, using ultrasonic - assisted extraction. The total phenolic content, DPPH radical scavenging activity (EC₅₀) and reducing power (EC₅₀) under suitable condition, were 48.49 mg GAE/g dry extract, 0.13 and 0.06 mg/ml, respectively. The present study suggested that the *Gynura procumbens* extract could be a promising source of natural antioxidants.

Keywords: *Gynura procumbens* leaves, polyphenol, antioxidant activity, extraction conditions.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Oxidative stress là sự mất cân bằng giữa việc sản xuất các gốc tự do (free radicals) và hoạt động của các chất chống oxy hóa (antioxidants) trong cơ thể sinh vật. Sự mất cân bằng oxy hóa là nguyên nhân của nhiều loại bệnh tật nguy hiểm như ung thư (Nidhin *et al.*, 2015), mất hoặc suy giảm trí nhớ, xơ vữa động mạch (Pohanka, 2013), suy tim, nhồi máu cơ tim (Singh *et al.*, 1995), viêm loét dạ dày, thấp khớp và thoái hóa khớp (Sara *et al.*, 2015). Để giảm nguy cơ mắc các bệnh do sự mất cân bằng oxy hóa gây ra, các chất chống oxy hóa được sử dụng phổ biến trong ngành công nghiệp dược phẩm. Chất chống oxy hóa được sử dụng thường có nguồn từ tổng hợp và nguyên liệu tự nhiên. Tuy nhiên, người tiêu dùng có xu hướng lo ngại các chất chống oxy hóa có nguồn gốc từ tổng hợp như butylated hydroxytoluene (BHT) và butylated hydroxyanisole (BHA) vì những chất này đã được chứng minh gây ra một số tác dụng không mong muốn như suy giảm đông máu, viêm phổi (Kahl and Kappus, 1993). Do đó, trong những năm gần đây, các nhà nghiên cứu và nhà sản xuất thực phẩm, dược phẩm quan tâm nhiều đến các hợp chất chống oxy hóa có nguồn gốc từ tự nhiên. Polyphenols là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật. Nhóm hợp chất này ngày càng nhận được nhiều sự quan tâm bởi các hoạt tính sinh học quan trọng của chúng như khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư (Kuriyama *et al.*, 2006). Những nghiên cứu dịch tễ học đã chỉ ra rằng chế độ ăn giàu polyphenol có khả năng ngăn ngừa nhiều loại bệnh cho con người (Kuriyama *et al.*, 2006).

Các hợp chất polyphenol đã được nghiên cứu thu nhận từ nhiều nguồn nguyên liệu tự nhiên khác nhau. Cây bầu đất *Gynura Procumbens* (Lour) Merr. phân bố rộng rãi ở các nước Đông Nam Á. Ở Việt Nam, bầu đất được trồng nhiều ở các tỉnh ven biển miền Trung và được sử dụng để giải độc, thanh nhiệt, tiêu viêm, lợi tiểu và chống lão hóa (Nguyễn Thị Ngọc Huệ, 2012). Một số nghiên cứu gần đây cho thấy dịch chiết từ lá bầu đất có khả năng

ngăn ngừa và điều trị các bệnh về gan, thận, đường ruột, tim mạch và viêm loét (Iskander *et al.*, 2002); giảm hàm lượng cholesterol và triglyceride trong máu (Young and Woodside, 2001) và đường huyết (Hassan *et al.*, 2010). Polyphenol là nhóm hợp chất được chứng minh là có những tác dụng sinh học kể trên và có trong lá bầu đất.

Đã có một số công trình nghiên cứu về tách chiết các hợp chất polyphenol từ lá bầu đất trồng tại một số nước ở Đông Nam Á như Indonesia (Sadikun *et al.*, 1996) và Malaysia (Rosidah *et al.*, 2008; Atiqah *et al.*, 2014). Điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu được chứng minh là có ảnh hưởng lớn đến các chất có hoạt tính sinh học trong thực vật (Rebogile *et al.*, 2014). Do vậy, giả thuyết đặt là lá bầu đất trồng tại Việt Nam sẽ có những tính chất khác so với đối tượng cùng loại được trồng tại nước khác. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá sự ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ lá bầu đất trồng tại Khánh Hòa, Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Lá bầu đất

Lá bầu đất sử dụng trong nghiên cứu được thu hái tại vườn trồng của người dân ở thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa vào tháng 01 năm 2015. Lá bầu được sấy khô ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 7 giờ. Nguyên liệu khô được nghiền nhỏ và sàng qua lưới sàng có đường kính 0,1 mm. Bột lá bầu đất khô được bao gói chân không trong bao bì PA và bảo quản ở nhiệt độ -40°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm.

2.2. Hóa chất và thuốc thử

2,2' - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH), acid gallic, thuốc thử Folin - Ciocalteu, Potassium ferricyanide ($K_3Fe[CN]_6$), Aluminium chloride ($AlCl_3$), acid trichloric (TCA), Sodium carbonate (Na_2CO_3) mua từ công ty Sigma Aldrich (Hoa Kỳ); Ethanol và methanol mua từ công ty Merck (Đức).

2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện chiết

Phương pháp nghiên cứu đơn yếu tố được sử dụng. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả nghiên cứu của thí nghiệm trước.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của loại dung môi chiết, sử dụng 3 loại dung môi khác nhau bao gồm: nước, methanol 100% và ethanol 100%. Các thông số khác về thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được giữ cố định với giá trị tương ứng là: 30 phút, 60°C và 1/50 g/ml. Loại dung môi chiết thích hợp được chọn dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa.

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của lá bầu đất được nghiên cứu ở các mức 0%, 25%, 50%, 75% và 100%. Các thông số khác được giữ cố định bao gồm: dung môi chiết thích hợp được lựa chọn từ thí nghiệm trước, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 30 phút, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 (g/ml). Nồng độ dung môi chiết thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được nghiên cứu ở các mức 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 và 1/60 (g/ml). Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại và nồng độ dung môi chiết thích hợp được lựa chọn từ các thí nghiệm trước, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 30 phút. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được thực hiện ở 30, 45, 60, 75 và 90°C. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp được chọn từ các thí nghiệm trước, thời gian chiết 30 phút. Nhiệt độ chiết thích hợp được chọn dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa.

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được nghiên cứu ở các mức 10, 20, 30, 40, 50 và 60 phút. Các thông

số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và nhiệt độ chiết thích hợp được lựa chọn từ các thí nghiệm trước. Thời gian chiết thích hợp được chọn dựa vào hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa.

Để đánh giá ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hiệu quả chiết các hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của lá bầu đất, nguyên liệu được chiết trong điều kiện thích hợp (loại dung môi chiết, nồng độ dung môi chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết, nhiệt độ chiết, thời gian chiết) được lựa chọn từ các thí nghiệm trên, trong điều kiện có sự hỗ trợ của sóng siêu âm và không có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Điều kiện chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm như sau: mẫu được chiết trong bể siêu âm Bể siêu âm S15 - S900H (Elma Co., Đức) và tần số của sóng siêu âm là 37 Hz.

Đối với tất cả quá trình chiết ở trên, 1 g nguyên liệu khô được sử dụng cho mỗi lần chiết. Quá trình chiết tĩnh được thực hiện trong bể ổn nhiệt. Dịch lọc thu được sau quá trình lọc hút chân không, được cô đặc bằng thiết bị cô quay chân không R210 (Buchi, Thụy Sĩ) ở nhiệt độ là 45°C và áp suất chân không là 123 mBar. Cô đặc đến khi thể tích dịch chiết còn lại khoảng 10 ml. Dịch chiết cô đặc được sử dụng để đánh giá hàm lượng polyphenol tổng, khả năng chống oxy hóa và độ ẩm. Số liệu về hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa được tính dựa trên hàm lượng chất khô của dịch chiết.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp của Singleton *et al.* (1999). Lấy chính xác 0,1 ml dịch chiết bỏ vào 0,9 ml nước cất. Sau đó cho thêm 1 ml thuốc thử Folin - Ciocalteu 10% và 2,5 dung dịch ml Na_2CO_3 7,5%. Hỗn hợp được lắc đều bằng máy Vortex trong thời gian 30 giây trước khi giữ ở điều kiện tối và nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó hỗn hợp được đo ở bước sóng 760 nm trên máy quang phổ kế Carry 50 (Spectrophotometry, Varian, Australia). Acid

gallic được dùng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu diễn bằng miligam acid gallic tương đương (mg GAE)/g dịch chiết khô.

2.4.2. Xác định tổng năng lực khử

Năng lực khử được xác định theo phương pháp của Oyaizu (1986) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Lấy 1 ml dịch chiết trộn với đệm phosphate pH = 6,6 để đạt được thể tích cuối cùng 1,5 ml trước khi thêm 0,5 ml dung dịch $K_3(Fe(CN)_6)$ 1%. Hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó thêm 0,5 ml dung dịch TCA (Trichloric acid) 10% và 2 ml nước cất, cuối cùng cho thêm 0,4 ml dung dịch $AlCl_3$ 0,1%. Độ hấp thụ quang học được xác định tại bước sóng 700 nm. Độ hấp thụ quang học càng cao thì năng lực khử càng mạnh. Kết quả báo cáo bởi giá trị EC_{50} là nồng độ dịch chiết cho độ hấp thụ quang là 0,5.

2.4.3. Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết được xác định theo phương pháp của Fu and Shieh (2002) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Dịch chiết được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau và trộn với nước cất để đạt thể tích tổng cộng 3 ml. Sau đó thêm 1 ml dung dịch DPPH 0,1 mM (pha trong ethanol 99,5%), lắc đều và để yên trong bóng tối 30 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$DPPH (\%) = 100 \times (ACT - ASP)/ACT.$$

Trong đó:

ACT: Độ hấp thụ quang học của mẫu trắng không chứa dịch chiết;

ASP: Độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa dịch chiết.

Kết quả báo cáo bởi giá trị EC_{50} là nồng độ dịch chiết cho khả năng khử gốc tự do DPPH là 50%.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (mean $\pm$ SD). Phần mềm Microsoft Excel 2007 và SPSS 16.0 được sử dụng để tính toán số liệu và vẽ đồ thị. Giá trị

trung bình được phân tích ANOVA theo phép thử Duncan. Giá trị $P < 0,05$ chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê.

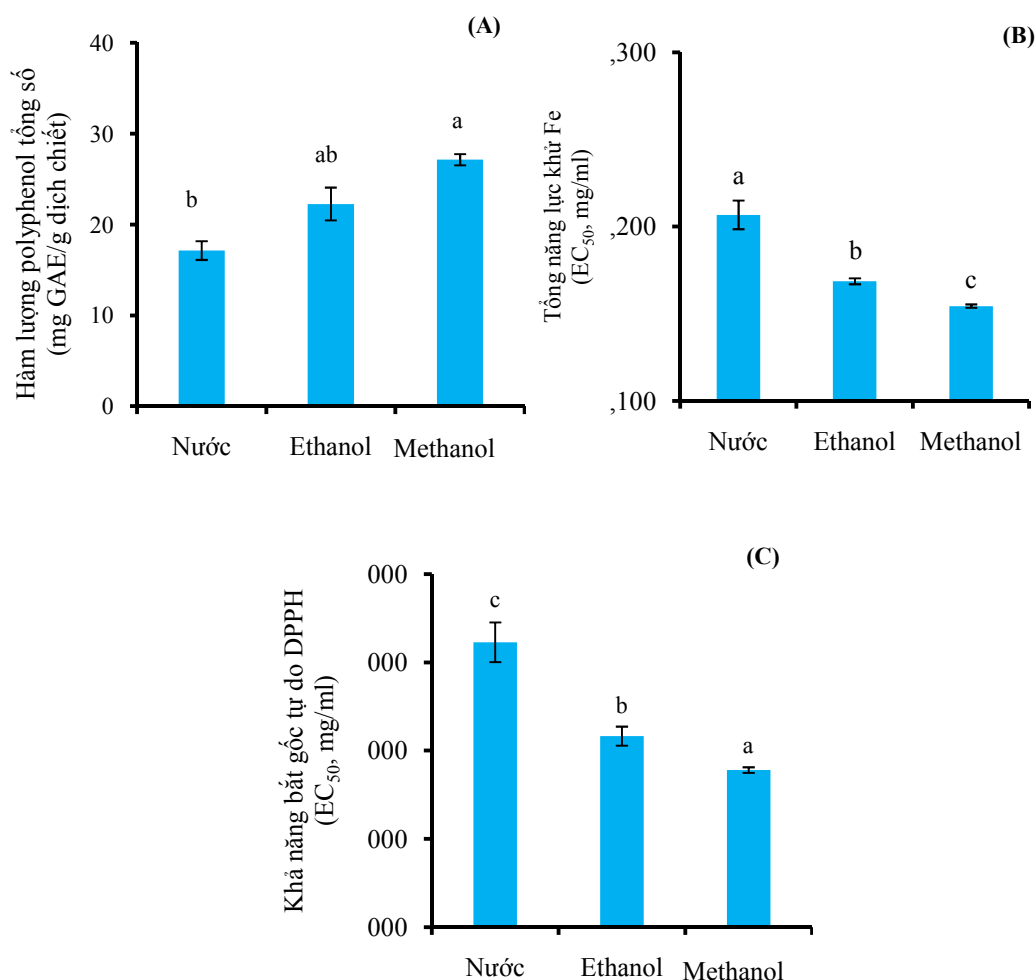
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

Dung môi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Trong nghiên cứu hiện tại, các loại dung môi chiết có độ phân cực khác nhau bao gồm methanol, ethanol và nước được sử dụng. Hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết lá bầu đất (27,15 mg GAE/g dịch chiết) đạt cao nhất ($P < 0,05$) khi chiết bằng dung môi methanol; tiếp theo là ethanol và nước (Hình 1-A). Hiệu suất chiết phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi và bản chất của chất cần thu nhận trong nguyên liệu. Polyphenol có nhiều nhóm chức, mỗi nhóm có độ phân cực khác nhau (Peschel *et al.*, 2006). Kết quả của nghiên cứu hiện tại phù hợp với nghiên cứu của Atiqah *et al.* (2014) trên nguyên liệu lá bầu đất trồng tại Malaysia. Theo đó, hàm lượng polyphenol trong dịch chiết methanol cao nhất và trong dịch chiết nước là thấp nhất. Bushra *et al.* (2009) nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi chiết (ethanol 100%, methanol 100%, ethanol 80% và methanol 80%) đến hàm lượng polyphenol tổng số của một số loài thảo dược trồng tại Pakistan cho thấy methanol cho hiệu quả chiết polyphenol cao hơn các dung môi chiết khác trên các nguyên liệu *Moringa oleifera*, *Eugenia jambolana*, *Acacia nilotica*, *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna* và *Ficus religiosa*. Methanol cũng được chứng minh là dung môi chiết thích hợp để thu nhận polyphenol từ nhiều nguồn nguyên liệu thực vật khác nhau (Nurhanan and Wan Rosli, 2012).

Ảnh hưởng của loại dung môi chiết đến khả năng chống oxy hóa từ dịch chiết lá bầu đất cũng có xu hướng tương tự như hàm lượng polyphenol tổng số. Đối với năng lực khử, dịch

Ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) trồng tại Khánh Hòa



Hình 1. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) của dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

chiết thu được khi sử dụng methanol, ethanol và nước có giá trị EC_{50} lần lượt là 0,21; 0,17; 0,15 mg/ml và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) (Hình 1-B). Khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết methanol cao nhất trong số các dung môi sử dụng trong nghiên cứu ($P < 0,05$). Giá trị EC_{50} của dịch chiết lá bầu đất của ba loại dung môi chiết methanol, ethanol và nước lần lượt là 0,09; 0,11; 0,16 mg/ml (Hình 1-C). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng hòa tan polyphenol trong dung môi chiết phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi, trong đó methanol và ethanol là một trong những dung môi thích hợp nhất, được sử dụng rộng rãi để chiết tách polyphenol từ thực vật (Tabart *et al.*,

2007; Wang *et al.*, 2008). Dựa vào kết quả này, dung môi methanol được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu.

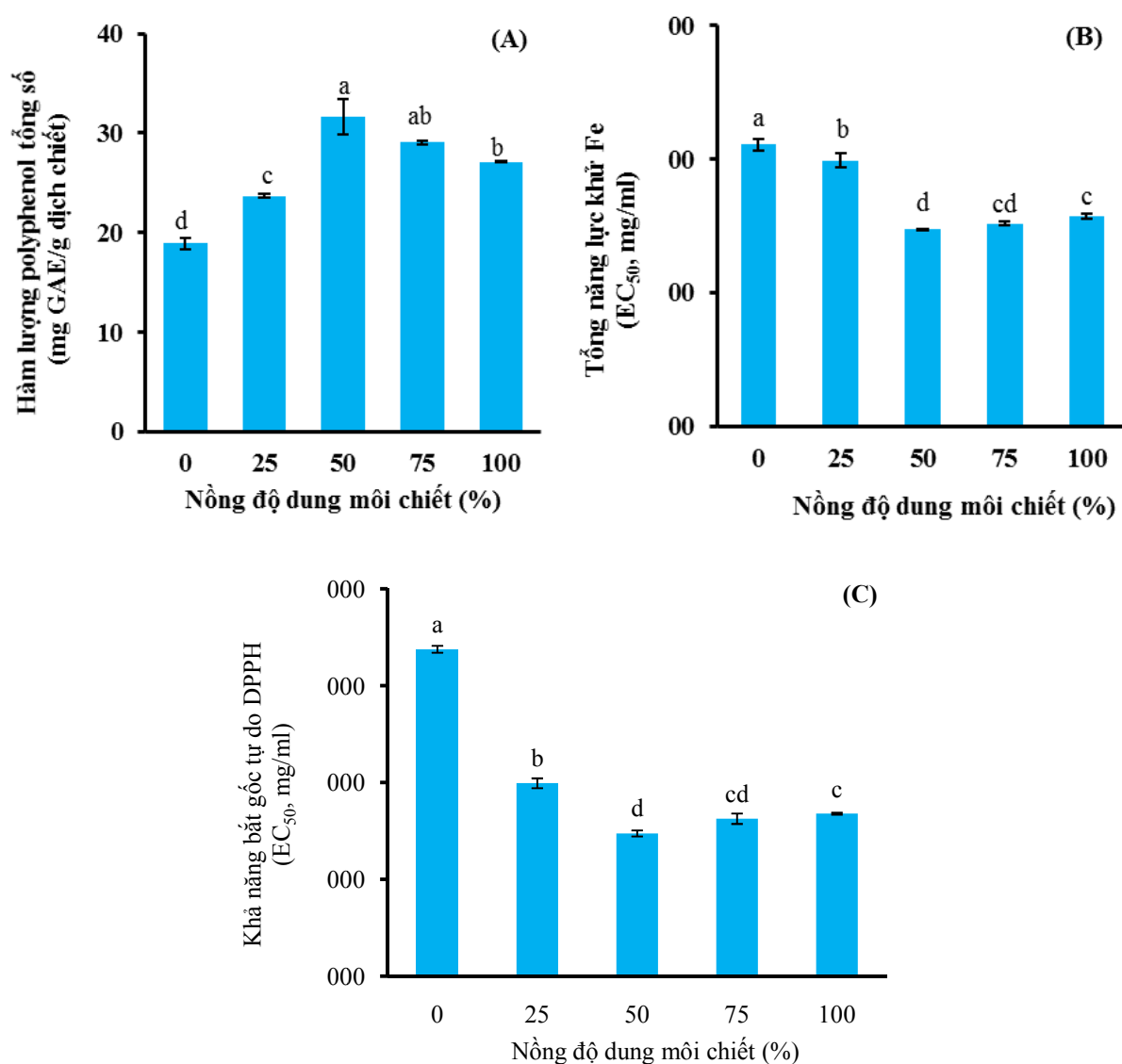
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

Ảnh hưởng của nồng độ methanol trong nước (0 - 100%) đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa được nghiên cứu. Kết quả cho thấy khi tăng nồng độ methanol từ 0 lên 50% thì hàm lượng polyphenol tổng số tăng từ 18,9 đến 31,61 mg GAE/g dịch chiết. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ methanol từ 50 đến 100% thì hàm lượng giảm xuống ($P < 0,05$) (Hình 2-A). Như vậy, hỗn

hợp methanol trong nước (50%) cho hiệu quả chiết cao hơn so với dung môi đơn lẻ. Tuy nhiên, nồng độ thích hợp là khác nhau đối với các loài thực vật (Chew *et al.*, 2011). Ví dụ, khi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ methanol đến hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch chiết lá *Limnophila aromatica*, Do *et al.* (2014) báo cáo rằng 75% là nồng độ cho hiệu quả chiết các hợp chất polyphenol cao nhất (35,7 mg GAE/g). Khi sử dụng nước là dung môi chiết, một lượng lớn

protein, polysaccaride và các chất vô cơ khác có thể cũng sẽ được trích ra khỏi nguyên liệu và làm cản trở quá trình hòa tan các hợp chất polyphenol (Koffi *et al.*, 2000; Boeing *et al.*, 2014).

Tổng năng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH cũng có xu hướng tương tự. Ở nồng độ methanol 50%, tổng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất. Dựa trên kết quả thu được, methanol 50% được sử dụng để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



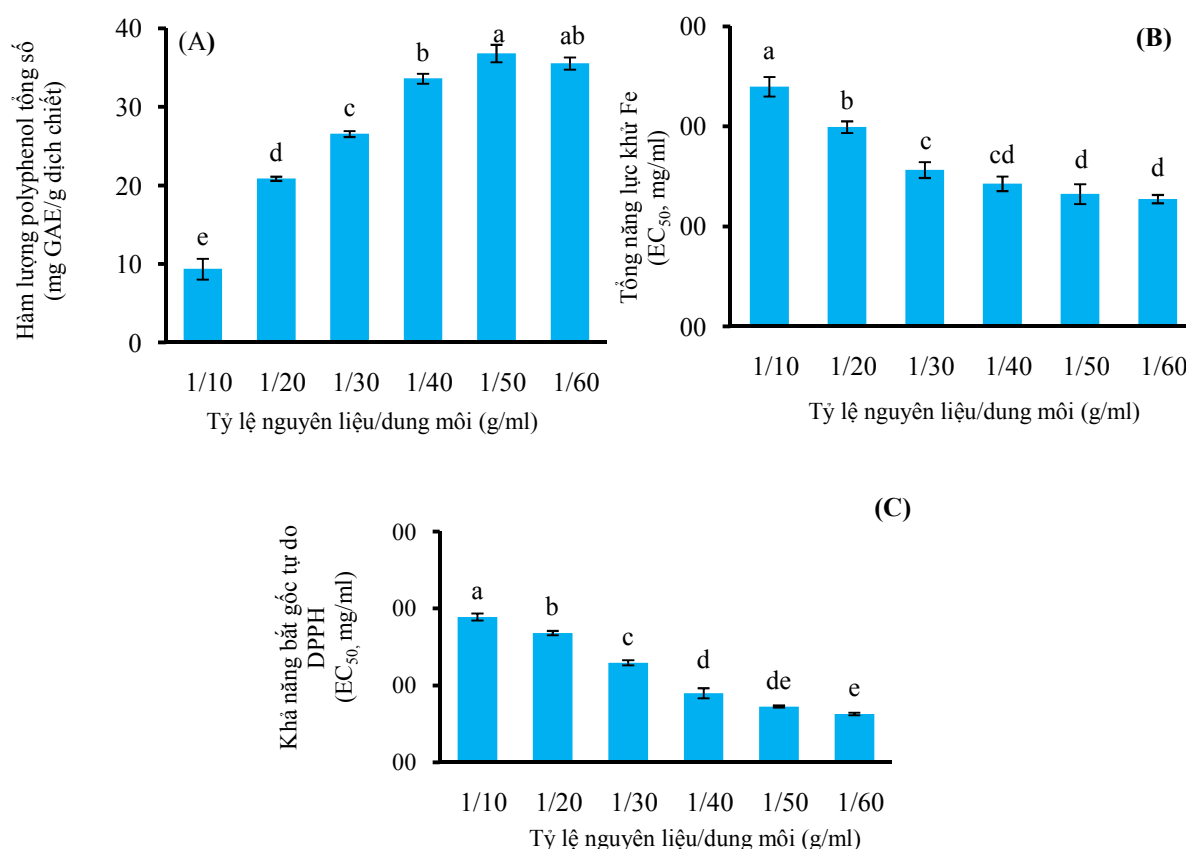
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) trong dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.3. Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (NL/DM) từ 1/10 đến 1/60 đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được mô tả ở hình 3. Khi tỉ lệ giảm từ 1/10 xuống 1/50 (g/ml) thì hàm lượng polyphenol chiết tăng lên đáng kể từ 9,37 lên 36,82 mg GAE/g dịch chiết. Trong đó, ở tỷ lệ NL/DM là 1/50 (g/ml) cho hàm lượng polyphenol cao nhất. Tuy nhiên, tiếp tục giảm tỉ lệ xuống 1/50 và 1/60, hàm lượng polyphenol giảm không đáng kể ($P > 0,05$). Tổng năng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH cũng có xu hướng tương tự. Ở tỉ lệ 1/50 (g/ml), tổng lực khử và khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất.

Điều này có thể được lý giải vì khi tăng tỉ lệ NL/DM dẫn đến sự chênh lệch gradient nồng độ của các chất cần chiết trong nguyên liệu với môi trường chiết nên hiệu quả chiết giảm (Gertenbach, 2001). Ở các tỷ lệ dung môi methanol với nước theo các tỉ lệ khác nhau thì ta có thể tạo ra một hệ dung môi mới có khả năng hòa tan được các polyphenol ở các mức độ khác nhau. Để chọn được một tỉ lệ NL/DM thích hợp cần phải tính đến hiệu quả chung của quá trình vì có liên quan đến chi phí năng lượng, thiết bị, chi phí dung môi, xử lý loại bỏ bã chiết và vấn đề về môi trường. Vì vậy, tùy vào mục đích cụ thể và lượng dịch chiết cần thu mà chọn tỉ lệ NL/DM chiết thích hợp. Với kết quả của nghiên cứu hiện tại, tỉ lệ NL/DM chiết là 1/50 (g/ml) được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



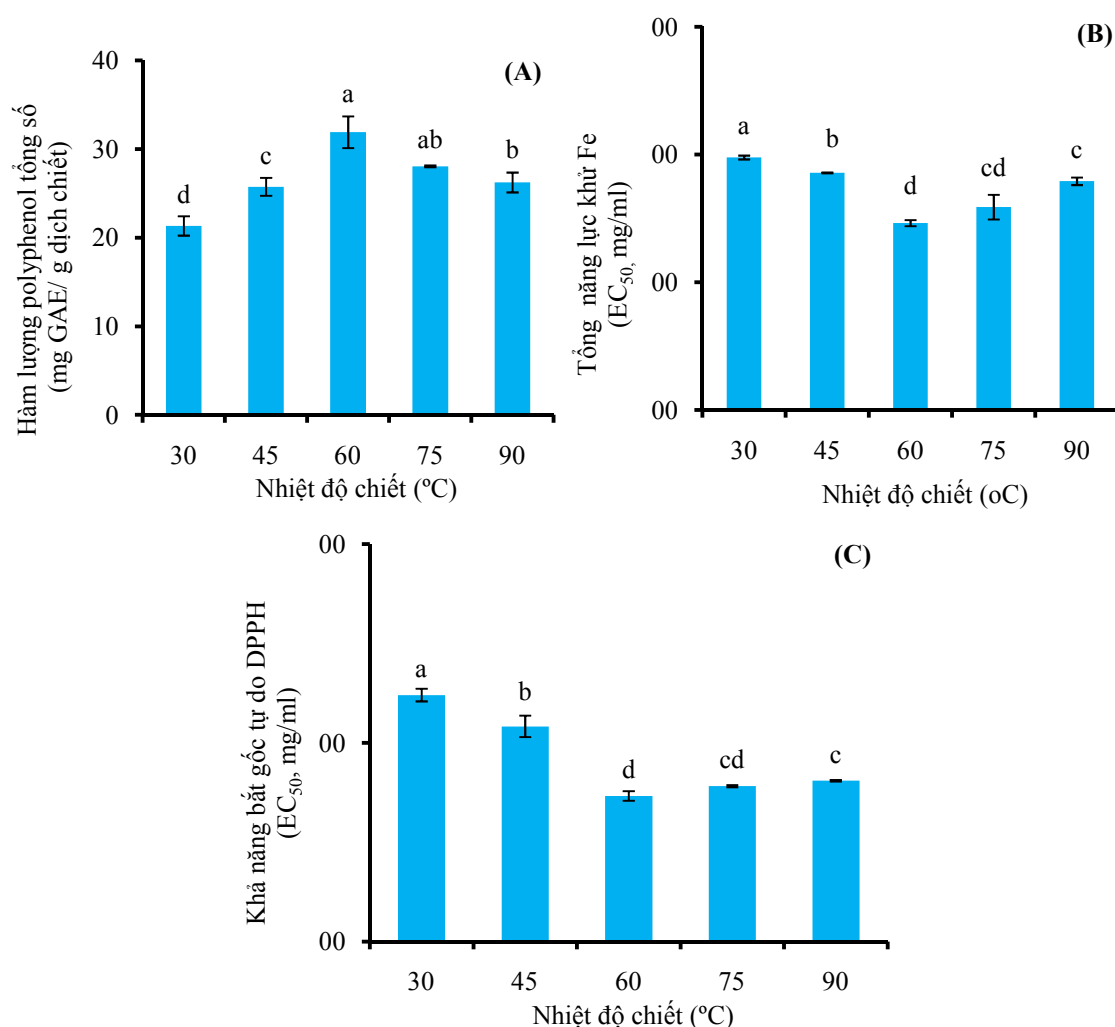
Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) trong dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

Nhiệt độ là một trong những thông số quan trọng ảnh hưởng đến quá trình trích ly các hợp chất polyphenol từ nguyên liệu thực vật. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nhiệt độ chiết (30, 45, 60, 75 và 90°C) đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa được nghiên cứu (Hình 4). Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch chiết lá bầu đất tăng lên theo chiều tăng của nhiệt độ trong khoảng từ 30 lên 60°C ($P < 0,05$);

hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch chiết ở nhiệt độ 30, 45 và 60°C lần lượt là 21,31; 25,74 và 31,89 mg GAE/g dịch chiết. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ từ 60 đến 90°C thì hàm lượng các hợp chất polyphenol trong dịch chiết có xu hướng giảm. Điều này được giải thích như sau: khi nhiệt độ chiết tăng, sẽ làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của các hợp chất polyphenol; làm giảm độ nhớt của dung môi; cũng như tăng quá trình chuyển chất và sự thẩm ướt của nguyên liệu chiết, qua đó sẽ làm tăng hiệu quả chiết các hợp chất polyphenol (AlFarsi and Lee, 2008; Wang *et al.*, 2008).



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) trong dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Trong nghiên cứu này, hiệu quả chiết tăng lên theo chiều tăng của nhiệt độ trong khoảng 30 đến 60°C và có xu hướng giảm xuống khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết. Kết quả này có thể là do nhiệt độ cao sẽ phá hủy một số nhóm chất chống oxy hóa không bền với nhiệt độ (Liyana and Shahidi, 2005). Khi tăng nhiệt độ chiết, các hợp chất polyphenol trong nguyên liệu bị phân hủy do các phản ứng thủy phân, oxy hóa nội tại và polymer hóa (Simon *et al.*, 1990). Đối với khả năng chống oxy hóa, nhiệt độ chiết ảnh hưởng rõ rệt đến tổng năng lực khử sắt và khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết từ lá bầu đất. Về tổng năng lực khử, khi tăng nhiệt độ chiết từ 30 lên 60°C thì giá trị EC_{50} của dịch chiết lá bầu đất giảm từ 0,20 đến 0,15 mg/ml. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết từ 75 đến 90°C thì tổng năng lực khử của dịch chiết có xu hướng giảm; giá trị EC_{50} của dịch chiết tăng từ 0,16 lên 0,18 mg/ml. Khả năng bắt gốc tự do DPPH cũng có xu hướng tương tự. Ở 60°C có khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất. Dựa trên kết quả thu được, 60°C được sử dụng để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

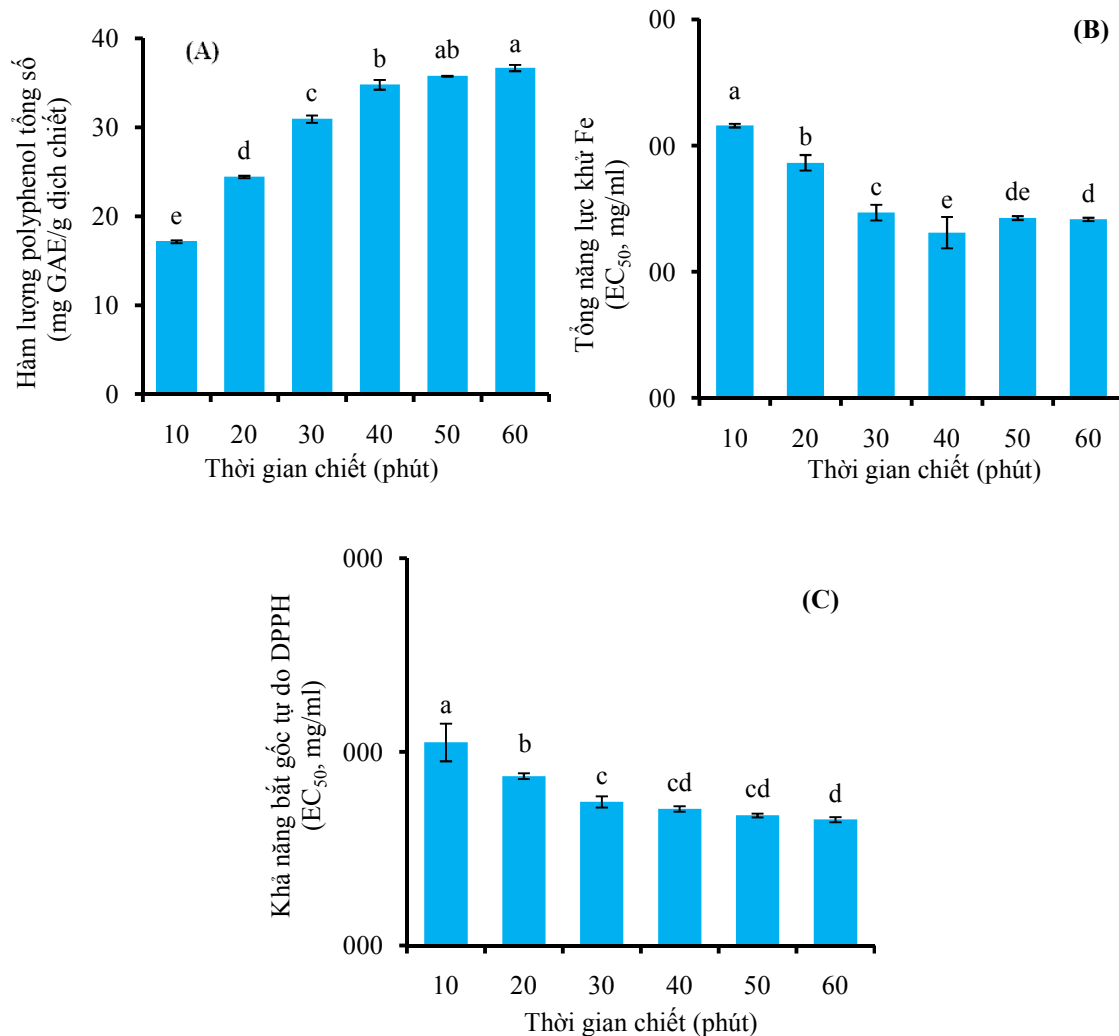
Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được mô tả trong Hình 5. Khi tăng thời gian chiết từ 10 đến 40 phút thì hàm lượng này tăng nhanh từ 17,16 đến 34,80 mg GAE/g dịch chiết và 40 phút là thời gian chiết thu được hàm lượng này cao nhất. Tuy nhiên, tiếp tục tăng thời gian chiết lên 50 và 60 phút thì hàm lượng polyphenol tổng số chỉ tăng nhẹ và không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($P \geq 0,05$) (Hình 5-A). Điều này có thể được giải thích bởi định luật thứ hai của Fick về sự khuếch tán, khi thời gian chiết tăng thì hàm lượng các chất trong nguyên liệu khuếch tán từ tế bào ra ngoài càng nhiều (Cracolice and Peters, 2009). Tuy nhiên, hiệu quả chiết các chất có hoạt tính sinh học sẽ không tăng sau khoảng thời gian nhất định. Khoảng thời gian

này phụ thuộc vào các điều kiện chiết khác như dung môi, nhiệt độ chiết, tỷ lệ DM/NL cũng như bản chất của nguyên liệu và hợp chất cần tách chiết (Silva *et al.*, 2007), khi kéo dài thời gian chiết các hợp chất polyphenol bên trong và ngoài nguyên liệu gần đạt trạng thái cân bằng nên dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol tổng số tăng chậm dần về sau. Ngoài ra, các hợp chất này có thể bị oxy hóa bởi các yếu tố bất lợi từ môi trường chiết (nhiệt độ, ánh sáng, oxy) (Naczka and Shahidi, 2004).

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được thể hiện ở hình 3-C. Kết quả cho thấy thời gian chiết ảnh hưởng rõ rệt đến tổng năng lực khử sắt và khả năng bắt gốc tự do DPPH. Về tổng năng lực khử, khi tăng thời gian chiết từ 10 đến 40 phút, năng lực khử của dịch chiết lá bầu đất tăng dần nên giá trị EC_{50} của dịch chiết có xu hướng giảm dần. Cụ thể giá trị EC_{50} của dịch chiết sử dụng thời gian chiết 10, 20, 30 và 40 phút lần lượt là 0,22; 0,19; 0,15 và 0,13 mg/ml. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thời gian chiết từ 40 đến 60 phút thì tổng năng lực khử của dịch chiết có xu hướng giảm dần nên giá trị EC_{50} của dịch chiết sử dụng thời gian chiết từ 50 đến 60 phút tăng từ 0,16 lên 0,18 mg/ml. Đối với năng lực khử, giá trị EC_{50} của dịch chiết lá bầu đất trong dải thời gian chiết 10, 20, 30, 40 phút lần lượt là: 0,22; 0,19; 0,15; 0,13 mg/ml ($P < 0,05$). Từ kết quả phân tích trên cho thấy thời gian thích hợp cho quá trình chiết lá bầu đất là 40 phút.

3.6. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất

Chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm đã được chứng minh có thể nâng cao hiệu quả thu nhận các chất dinh dưỡng cũng như chất có hoạt tính sinh học từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Trong nghiên cứu này ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất được đánh giá (Hình 6). Kết quả cho thấy so với phương pháp chiết tĩnh, sóng siêu âm đã nâng



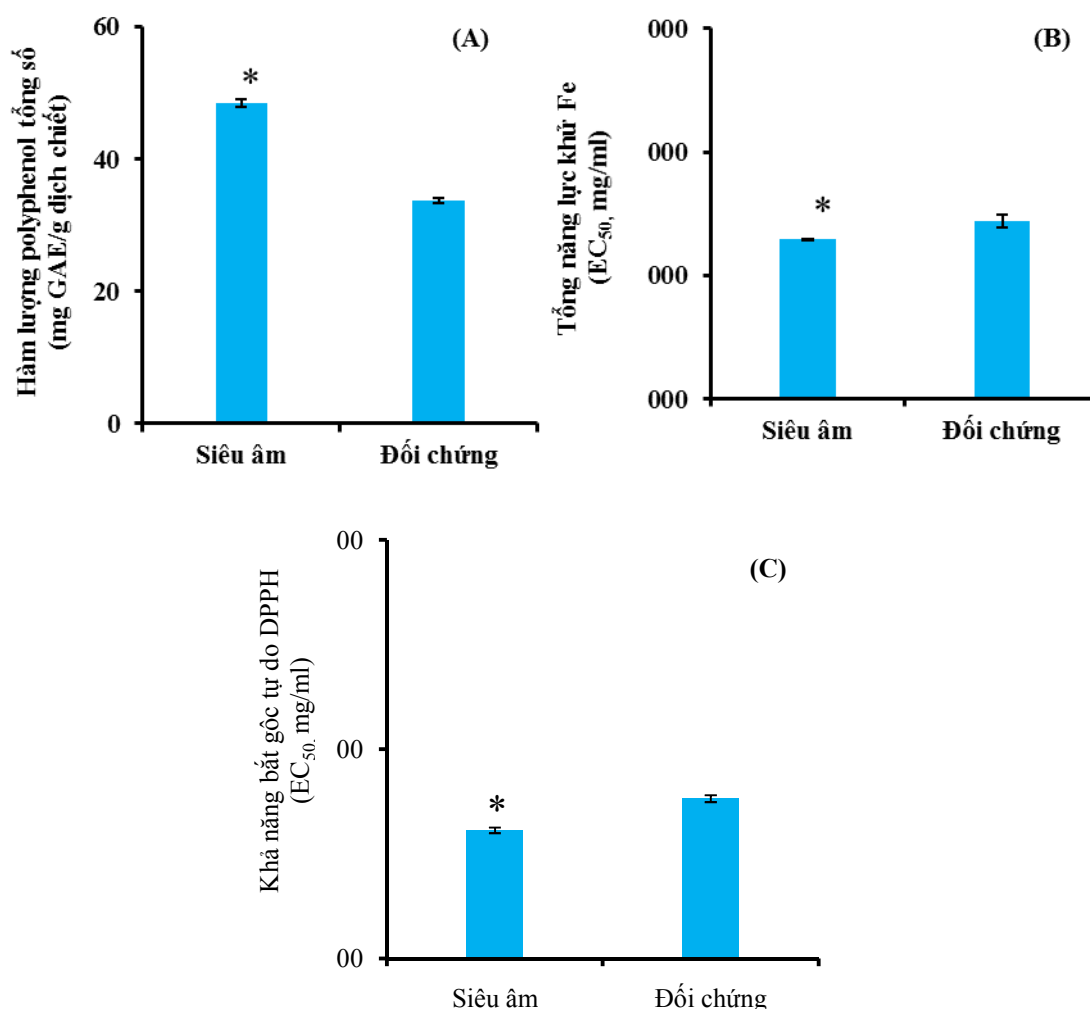
Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) trong dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

cao hiệu quả thu nhận hàm lượng các hợp chất polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ lá bầu đất. Hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết sử dụng sóng siêu âm là 48,49 mg GAE/g dịch chiết, giá trị này cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với mẫu ĐC chiết trong điều kiện tĩnh (33,65 mg GAE/g dịch chiết) (Hình 6-A). Xu hướng ảnh hưởng của sóng siêu âm đến khả năng chống oxy hóa của dịch chiết cũng tương tự như hàm lượng các hợp chất polyphenol (Hình 6-B-C). Đối với tổng năng lực khử, giá trị EC₅₀ của dịch chiết lá bầu đất khi sử dụng sóng siêu âm và chiết tĩnh lần lượt là 0,129 và 0,144 mg/ml và đối với khả năng bắt gốc tự do DPPH lần lượt là 0,06; 0,08 mg/ml.

Sự tăng hiệu quả chiết các hợp chất polyphenol có thể được giải thích như sau: với cơ chế tác động đa chiều, sóng siêu âm tạo ra hiệu ứng vật lý và cơ học, thay đổi cấu trúc, trạng thái của nguyên liệu tăng cường sự tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi chiết làm tăng sự khuếch tán của các hợp chất polyphenol vào dung môi (Cárcel *et al.*, 2012; Gogate and Kabadi, 2009). Hiệu suất chiết tăng do sóng siêu âm làm tăng mức độ khuấy trộn và làm “lỏng” cấu trúc của nguyên liệu dẫn đến tốc độ khuếch tán của các hợp chất từ nguyên liệu đặc biệt polyphenol ra môi trường tăng (Fazlena *et al.*, 2013; Jian *et al.*, 2008). Như vậy, việc sử dụng

Ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá bầu đất (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) trồng tại Khánh Hòa



Hình 6. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol tổng số (A), tổng năng lực khử (B) và khả năng khử gốc tự do DPPH (C) trong dịch chiết lá bầu đất

Ghi chú: Dấu * trên cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

sóng siêu âm để hỗ trợ quá trình chiết giúp nâng cao hiệu quả thu nhận dịch các hợp chất polyphenol và dịch chiết có khả năng chống oxy hóa từ lá bầu đất.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định được điều kiện chiết thích hợp để thu được dịch chiết có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ lá bầu đất: sử dụng dung môi methanol 50%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết là 1/50 (g/ml), nhiệt độ chiết là 60°C, thời gian chiết là 30 phút và có sự hỗ

trợ của sóng siêu âm. Kết quả của nghiên cứu cho thấy lá bầu đất có thể là nguồn nguyên liệu tiềm năng để chiết xuất chất chống oxy hóa tự nhiên. Đây là báo cáo đầu tiên về hoạt tính chống oxy hóa của lá bầu đất trồng tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alfarsi, M. A., Lee, C.Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food Chemistry, 108: 977 - 985.
- Atiqah, A., Halimhimi, Z.M., Amirin, S., Sabariah, I. (2014). Antioxydant properties of *Gynura*

- Procumbens extracts and their inhibitory effects on two major human recombinant cytochrome P450S using a high throughput luminescence assay. *Asian J Pharm Clin Res.*, 7(5): 36 - 41.
- Boeing, J.S., Barizão, É.O., Costa e Silva, B., Montanher, P.F., Almeida, J., Visentainer, J.V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8: 48 - 57.
- Bushra, S., Farooq, A., Muhammad, A. (2009). Effect of extraction solvent/Technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecule*, 14: 2167 - 2180.
- Cárcel, J. A., García - Pérez, J. V., Benedito, J., Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110: 200 - 207.
- Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M. Z., Wan, Aida, W.M., and Ho, C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18: 571 - 578, 1427 - 1435.
- Cracolice, M., Peters, E. (2009). Basics of introductory chemistry: an active learning approach, CA: Brooks/Cole.
- Fazlena, H., Norsuraya, S., Nadiyah, S.N. (2013). Ultrasonic assisted enzymatic reaction: An overview on ultrasonic mechanism and stability - activity of the enzyme. *Business Engineering and Industrial Applications Colloquium (BEIAC)*, 2013 IEEE, pp. 85 - 90.
- Fu, H.Y., Shieh, D.E. (2002). Antioxydant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipid*, 9: 35 - 46.
- Gertenbach, D. (2001). Solid - liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals. In: Mazza G, Maguer ML Shi J (Eds.). *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Boca Raton: CRC Press, pp. 331 - 66.
- Gogate, P.R. and Kabadi, A.M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 60 - 72.
- Hassan, Z., Mun, F.Y., Mariam A., Ahmad P.M.Y. (2010). Antidiabetic properties and mechanism of action of *Gynura procumbens* water extract in streptozotocin - induce diabetic rats. *Molecules*, 15: 9008 - 9023
- Iskander, M.N., Song, Y., Coupar, I.M., Jiratchariyakul, W. (2002). Antiinflammatory screening of the medicinal plant *Gynura procumbens*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57: 233 - 244.
- Jian, S., Wenyi, T., and Wuyong, C. (2008). Ultrasound - accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. *Journal of Cleaner Production*, 16(5): 591 - 597.
- Kahl, R., Kappus, H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *European Food Research and Technology*, 196 (4): 329 - 338.
- Koffi, E., Sea, T., Doehe, Y., Soro, S. (2010). Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 5(3): 550 - 558.
- Kuriyama, S., Shinazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N. (2006). Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA*, 296(10): 1255 - 1265.
- Liyana, P.C. M., Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93: 47 - 56.
- Naczki, M., Shaiddi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, 1054(1 - 2): 95 - 111.
- Nguyễn Thị Ngọc Huệ (2012). *Cây bầu đất. Tài nguyên thực vật di truyền Việt Nam*.
- Nidhin, J., Yanli, Z.J., Andras, P., Stephen, V.F., (2015). Oxidative stress and ADHD A Meta - analysis. *Journal of Attention Disorders*, 19(11): 915 - 924.
- Nurhanan, A.R., Wan Rosli, W.I. (2012). Evaluation of polyphenol content and antioxidant activities of some selected organic and aqueous extracts of cornsilk (*Zea Mays* Hairs). *Journal of Medical and Bioengineering*, 1: 48 - 51.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxydantative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin - layer chroma - tography. *Nippon Shokukhin Kogyo Gakkaishi*, 3(5): 771 - 775.
- Peschel, W., Sanchez, F., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela - Raventos, R., Buxaderas, S. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxydants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.*, 97: 137 - 150.
- Pohanka, M (2013). Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 21(3): 356 - 364.
- Rebogile, R.M., Olaniyi, A.Fawole., Marietjie, A.S., Umezuruike, L.O. (2014). Preharvest and postharvest factors influencing bioactive compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) - A review. *Scientia Horticulturae*, 178: 144 - 123.

- Rosidah, Yam M.F., Sadikun, A., Asmawi, M.Z. (2008). Antioxydant potential of *Gynura procumbens*. *Pharmaceutical Biology*, 46: 616 - 625.
- Sadikun, A., Idus, A., Ismail, N. (1996). Sterol and sterol glycosides from the leaves of *Gynura procumbens*. *Nat Prod Sci.*, pp. 19 - 23.
- Sara, J.F., Manuel, G., Francisco, D.A., Lucia, P.C., Miriam, G., Christoph, U.C. (2015). Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta - analysis. *J Clin Psychiatry*, 76 (22): 1658 - 1667.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F. and Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101: 1012 - 1018.
- Simon, B.F., Ilzarbe, J.P., Hernandez, C., Cordoves, G., Estrella. (1990). HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. Revised manuscript, pp. 35 - 37.
- Singh, N., Dhalla, A.K., Seneviratne, C., Singal, P.K. (1995). Oxidative stress and heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 147(1): 77 - 81.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela - Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenol and other oxydation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 299: 152 - 78.
- Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food chemistry*, 105: 1268 - 1275.
- Wang, J., Sun, B.G., Cao, Y., Tian, Y., Li, X.H. (2008). Optimization of ultrasound - assisted extraction of phenolic compound from wheat bran. *Food chemistry*, 106: 804 - 810.
- Young, I.S., Woodside, J.V. (2001). Antioxydants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176 - 186.