

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ HOẠT TÍNH CHỐNG OXI HÓA CỦA CÂY DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*) TRỒNG TẠI PHÚ YÊN

Nguyễn Tiến Toàn¹, Nguyễn Xuân Duy^{2*}

¹Trường Cao đẳng Công nghiệp Tuy Hòa, Thành phố Tuy Hòa, Phú Yên

²Trường Đại học Nha Trang, Thành phố Nha Trang, Khánh Hòa

Email*: duy.ntu.edu@gmail.com

Ngày gửi bài: 06.03.2014

Ngày chấp nhận: 22.05.2014

TÓM TẮT

Diệp hạ châu là một cây dược liệu quý đã được trồng với qui mô công nghiệp. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của cây Diệp hạ châu trồng tại Phú Yên. Những nhân tố ảnh hưởng đến quá trình chiết bao gồm: Loại dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết. Hàm lượng polyphenol được xác định bằng phương pháp so màu, hoạt tính chống oxi hóa được xác định dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH. Ngoài ra, tổng năng lực khử, mô hình oxi hóa β -carotene-linoleic và mô hình dầu nước cũng được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết thu được từ lá Diệp hạ châu. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, điều kiện chiết thích hợp là: Dung môi chiết ethanol 50%, thời gian 20 phút, nhiệt độ 60°C và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/ml). Dịch chiết từ lá Diệp hạ châu thể hiện hoạt tính chống oxi hóa trên các phép thử *in vitro* như khả năng khử gốc tự do DPPH, tổng năng lực khử, trên mô hình oxi hóa β -carotene-linoleic và mô hình dầu-nước. Những kết quả nghiên cứu này góp phần cung cấp những dẫn liệu khoa học quý giá về cây Diệp hạ châu.

Từ khóa: Chiết, Diệp hạ châu, hoạt tính chống oxi hóa, polyphenol.

Effect of Extracting Conditions on Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Diep Ha Chau (*Phyllanthus amarus*) Cultivated in Phu Yen

ABSTRACT

Diep ha chau (*Phyllanthus amarus*), a valuable medicinal plant, has been grown at the industrial scale recently. This study was carried out to evaluate effect of extracting conditions on polyphenol content and antioxidant activity of Diep ha chau cultivated in Phu Yen province. Factors influencing on extraction were investigated, including: Type of solvent (acetone 50%, ethanol 50%, methanol 50%, and water), time of extraction (5, 10, 20, 30, and 40 min), temperature of extraction (30, 40, 50, 60, and 70°C), and ratio between material and extracting solvent (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, and 1/50, g/ml). Polyphenol content was determined by spectrophotometric method, antioxidant activity was measured based on DPPH free radical scavenging ability. Additionally, total reducing power capacity, oxidation of β -carotene-linoleic acid model system, and oil-in-water emulsion model were also conducted to evaluate antioxidant activity of extract leaf from Diep ha chau. Research results showed that the suitable extraction condition as followed: Ethanol 50%, 20 min, 60°C, and a ratio of material/solvent 1/30 (g/ml). *Phyllanthus amarus* extract exhibited antioxidant activity on *in vitro* as DPPH, total reducing power, β -carotene-linoleic acid model system, and oil-in-water emulsion model. These results of the study provided valuable scientific data toward Diep ha chau medicinal plant.

Keywords: Antioxidant activity, Diep ha chau, extraction, polyphenol.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ lâu thực vật đã trở thành nguồn thực phẩm, nguồn dược liệu chủ yếu trong dân gian.

Từ thực tiễn cuộc sống, con người đã biết lựa chọn những loại thực vật vừa có tác dụng dinh dưỡng vừa có tác dụng điều trị các bệnh tật. Thực vật cũng là một nguồn tuyệt vời chứa các

chất chống oxi hóa (Huda-Faujan et al., 2009). Các hợp chất phenolics là những chất chống oxi hóa tự nhiên, được phát hiện phổ biến trong các loại thực vật. Chúng đã được báo cáo là có nhiều chức năng sinh học quý bởi vì chúng có khả năng trì hoãn hiệu quả quá trình oxi hóa chất béo và do đó góp phần cải thiện chất lượng và dinh dưỡng của thực phẩm (Marja et al., 1999; Jin and Rusell, 2010). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy trong thực vật chứa nhiều chất chống oxi hóa như: Phenolics, flavonoids, tannins, vitamins, quinines, coumarins, lignans, ligin (Cai et al., 2004; Amarowicz et al., 2004). Vì vậy, thực vật sẽ là một nguồn nguyên liệu tốt để thu nhận và ứng dụng các chất có hoạt tính sinh học.

Polyphenol là những hợp chất thơm có nhóm hydroxyl đính trực tiếp với nhân benzene (Lê Ngọc Tú và cs., 2002). Polyphenol có nhiều trong thực vật như: Rau, quả, hoa và một số bộ phận của thực vật. Polyphenol đóng vai trò hết sức quan trọng đối với đời sống thực vật như: Tạo màu sắc đặc trưng, bảo vệ thực vật khỏi những tác nhân xâm hại của côn trùng, sự oxi hóa và tác dụng của tia cực tím. Về y học, polyphenol là một trong những hợp chất tự nhiên có nhiều tác dụng như: Có tác dụng chống oxi hóa mạnh, kháng viêm, kháng khuẩn, chống dị ứng, chống lão hóa và một số bệnh tật liên quan đến ung thư (Jin and Rusell, 2010).

Diệp hạ châu là một loại dược liệu quý đã được sử dụng trong điều và chữa trị một số bệnh tật trong dân gian từ lâu. Chẳng hạn như: Diệp hạ châu có tác dụng mát gan, lợi tiểu, giải độc, điều trị các bệnh về đường tiêu hóa, điều trị bệnh tiểu đường, có tác dụng tích cực lên hệ thống miễn dịch. Tuy nhiên, những hiểu biết về hoạt tính sinh học của nó chưa được công bố một cách đầy đủ, đặc biệt là hoạt tính chống oxi hóa của nó. Hơn nữa, những công dụng của diệp hạ châu trước đây chủ yếu tập trung vào chữa bệnh, ít ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm. Những năm gần đây tại tỉnh Phú Yên, cây diệp hạ châu đã được chọn là một trong những cây dược liệu đầy tiềm năng, cây này được trồng với qui mô công nghiệp. Với điều kiện đất đai, thổ nhưỡng thuận lợi, Diệp

hạ châu trồng tại Phú Yên có những đặc tính quý, có chất lượng cao giúp cho nguồn dược liệu này có chất lượng khá tốt.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của cây diệp hạ châu trồng tại Phú Yên. Từ đó đề ra điều kiện tách chiết thích hợp. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp dữ liệu khoa học về điều kiện chiết cây diệp hạ châu để thu được hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa cao nhất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Cây diệp hạ châu

Diệp hạ châu sử dụng trong nghiên cứu là loại diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*). Nguyên liệu được thu hái trực tiếp tại ruộng trồng tại xã Hòa An, huyện Phú Hòa, tỉnh Phú Yên trong tháng 7/2013.

2.1.2. Hóa chất

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), axit Gallic, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), β -carotene, axit linoleic mua của hãng Sigma Aldride (USA). $K_3(Fe[CN]_6)$, $AlCl_3$, axit trichloroacetic (TCA), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , thuốc thử Folin-Ciocalteu, Tween 80, ethanol, methanol và acetone. Những hóa chất này mua từ hãng Merck (Đức). Tất cả hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều đạt hạng phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu cây diệp hạ châu được thu trực tiếp tại ruộng. Mẫu được chọn một cách ngẫu nhiên trên ba ruộng khác nhau, mỗi ruộng ($500m^2$), mỗi ruộng lại chọn ngẫu nhiên ba vị trí khác nhau (khoảng 0,5 kg/vị trí), sau đó trộn lại. Mẫu sau khi được thu hoạch, xác định các thông số về sinh trưởng như: Chiều cao, mức độ trưởng thành và tuổi thu hoạch. Mẫu tươi được phơi khô tự nhiên, sau đó tách riêng thành ba phần khác nhau: Lá, thân và rễ. Các phân tích về

thành phần khối lượng, hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa được tiến hành trên ba phần khác nhau để chọn phần có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất phục vụ cho những nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Công thức thí nghiệm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi chiết, sử dụng bốn loại dung môi có độ phân cực khác nhau, gồm: Acetone 50%, ethanol 50%, methanol 50% và nước. Các thông số về thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được giữ cố định với giá trị tương ứng là: 30 phút, 60°C và 1/25 (g/ml). Loại dung môi chiết thích hợp được chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất. Sau đó sử dụng dung môi này để nghiên cứu các thông số khác.

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của lá Diệp hạ châu được nghiên cứu ở các mốc thời gian 5, 10, 20, 30 và 40 phút. Các thông số khác cố định bao gồm: Dung môi chiết, nhiệt độ chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết là 1/25 (g/ml). Thời gian chiết thích hợp cũng được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất, cố định thông số này để nghiên cứu các thông số còn lại.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của lá Diệp hạ châu được thực hiện ở 30, 40, 50, 60 và 70°C. Các thông số cố định gồm: Dung môi chiết, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết. Nhiệt độ chiết thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa. Sau khi xác định được nhiệt độ chiết thích hợp, cố định thông số này để nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết.

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được nghiên cứu ở các mức 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 và 1/50 (g/ml). Các thông số cố định gồm: Dung môi chiết, thời gian chiết và nhiệt độ chiết. Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp cũng được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa.

Trong tất cả các thí nghiệm trên, nguyên liệu Diệp hạ châu khô được băm nhỏ bằng máy cắt (Super Blender, MX-T2GN, Matsushita Electric Industrial Co., Japan) trước khi tiến hành chiết, khối lượng nguyên liệu cho mỗi lần chiết là 2g. Quá trình chiết được thực hiện trong bể ử nhiệt (Elma, S 300H, Elmasonic, Germany) có kiểm soát nhiệt độ với độ chính xác $\pm 0,1$. Dịch lọc thu được sau quá trình ly tâm ở 4°C, tốc độ 5.000 rpm trong 15 phút (Centrifuge, Labentech, Mega 17R, Germany), được bay hơi dưới điều kiện giảm áp suất trên thiết bị cô quay chân không (RV10, Digital V, IKA, Germany) sau đó được hòa loãng lại trong nước cất đúng bằng thể tích dung môi chiết ban đầu để thu được dịch chiết thô, dịch chiết này được sử dụng để tiến hành các phân tích hoạt tính sinh học.

2.2.3. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo phương pháp của Singleton et al. (1999) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Cụ thể như sau: Dịch chiết được hòa loãng ở nồng độ thích hợp, sau đó 0,1ml dịch chiết đã pha loãng trộn với 0,9ml nước cất trước khi thêm 1ml thuốc thử Folin-Ciocalteu. Hỗn hợp được trộn đều trước khi thêm 2,5ml Na_2CO_3 7,5%. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được giữ ở 30°C trong 30 phút trước khi đi đo ở bước sóng 760nm sử dụng máy quang phổ kế (Carry 50, Varian, Australia). Kết quả được báo cáo bởi miligam axit Gallic tương đương (mg GAE)/g chất khô.

2.2.4. Xác định khả năng chống oxy hóa

- Xác định khả năng khử gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo phương pháp của Fu and Shieh (2002) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Cụ thể như sau: Khoảng 20-140 μ l dịch chiết đã pha loãng đến nồng độ thích hợp được trộn với nước cất để đạt thể tích tổng cộng 3ml. Sau đó thêm 1ml dung dịch DPPH 0,2mM, lắc đều và để yên trong bóng tối 30 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 517nm (Carry 50, Varian, Australia).

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$\text{DPPH (\%)} = 100 \times (A_{CT} - A_{SP}) / A_{CT}$$

Trong đó: A_{CT} : Độ hấp thu quang học của mẫu trắng không chứa dịch chiết, A_{SP} : Độ hấp thu quang học của mẫu có chứa dịch chiết. Kết quả báo cáo bởi giá trị IC_{50} là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao.

- Xác định tổng năng lực khử

Tổng năng lực khử được xác định theo phương pháp của Oyaizu (1986) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Cụ thể như sau: Nhiều thể tích khác nhau của dịch chiết được trộn với đệm phosphate pH = 6,6 để đạt thể tích cuối cùng 1,5ml trước khi thêm 0,5ml $K_3(Fe[CN]_6)$ 1%. Hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó thêm 0,5ml TCA 10% và 2ml nước cất, cuối cùng 0,4ml $AlCl_3$ 0,1% được thêm vào. Độ hấp thu quang học được xác định tại bước sóng 700nm. Độ hấp thu quang học càng cao thì năng lực khử càng mạnh. Kết quả được tính toán bởi giá trị IC_{50} , là lượng mẫu làm tăng độ hấp thu quang học lên 0,50.

- Xác định khả năng hạn chế sự oxi hóa chất béo trên mô hình β -carotene-linoleic

Hoạt tính chống oxi hóa chất béo trên mô hình β -carotene-linoleic được xác định theo phương pháp của Taga et al. (1984).

- Xác định khả năng hạn chế sự hình thành hydroperoxide trong mô hình dầu-nước

Hệ nhũ tương dầu-nước được chuẩn bị gồm: 10% dầu cá, 85% nước và 0,5% Tween 80. Hỗn hợp được đồng hóa ở tốc độ 10.000 rpm trong 5

phút (IKA, T18B, Ultra-Turax, Germany). Chính xác 2ml dịch chiết được trộn đều với 10ml hệ nhũ tương dầu-nước chứa trong ống nhựa 50ml có nắp đậy, đặt trong tủ ổn nhiệt ở 50°C, quá trình oxi hóa chất béo được quan sát hàng ngày. Hàm lượng hydroperoxide được xác định theo phương pháp của Richards and Hultin (2002). Hàm lượng hydroperoxide được xác định trên dịch chiết chất béo theo phương pháp của Bligh and Dyer (1959). Kết quả tính toán hàm lượng hydroperoxide từ đường chuẩn Cumene hydroperoxide (HPO) nồng độ từ 0-120 nmol/ml.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần để đảm bảo tiến hành phân tích ANOVA. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê chuyên dụng Statistica 8.0 (Stasoft, Tulsa, Ok, USA). Kiểm định Tukey được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần khối lượng của cây Diệp hạ châu

Kết quả ở bảng 1 cho biết: Lá là thành phần chiếm tỉ lệ cao nhất chiếm 46,6% theo khối lượng tươi và nếu tính theo khối lượng khô là 47,2%, tiếp đến là phần thân của cây chiếm 35,2% theo khối lượng tươi hoặc 33,9% theo khối lượng khô. Phần rễ chiếm tỉ lệ thấp nhất, khoảng 18,2% theo khối lượng tươi và theo khối lượng khô là 20,4%. Như vậy, phần chiếm tỉ lệ lớn nhất là lá, đây cũng được xem là thành phần chính để thu hồi làm nguyên liệu trong quá trình sản xuất dược liệu. Phần thân

Bảng 1. Thành phần khối lượng của cây Diệp hạ châu (n = 5)

Thành phần	Tươi		Khô	
	Khối lượng (g)	Tỉ lệ (%)	Khối lượng (g)	Tỉ lệ (%)
Lá	760 ± 39,1	46,6 ± 0,85	250 ± 29,8	47,2 ± 4,19
Thân	575 ± 34,6	35,2 ± 1,47	179 ± 9,6	33,9 ± 1,30
Rễ	298 ± 47,2	18,2 ± 2,19	109 ± 9,4	20,4 ± 1,84
Trung bình tổng	1.633	100	538	101,5

và rễ được xem là phần phế liệu. Tuy nhiên, hai thành phần này chiếm tới 53,4% theo khối lượng tươi hoặc 54,3% tính theo khối lượng khô, nếu bỏ đi sẽ gây lãng phí đồng thời có thể tác động xấu đến môi trường. Do đó, để nâng cao hơn nữa giá trị kinh tế của cây dược liệu quý này, cần quan tâm hơn nữa đến phụ phẩm từ cây Diệp hạ châu trong quá trình sản xuất dược liệu.

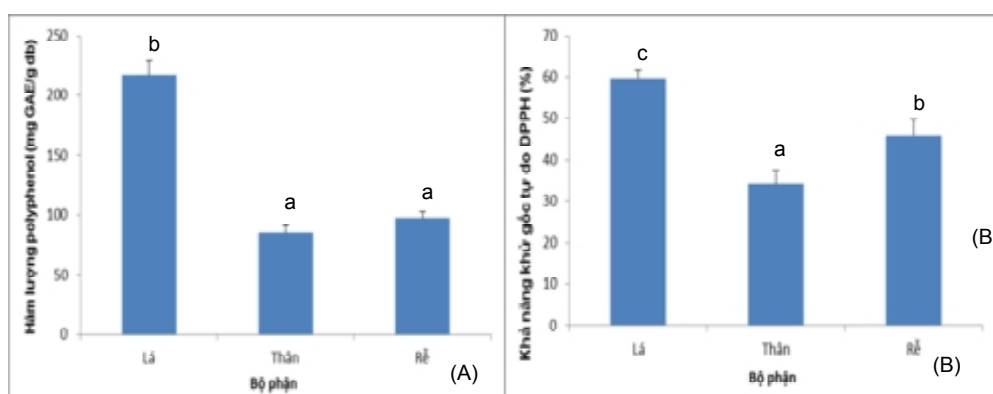
3.2. Hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa của cây Diệp hạ châu ở các bộ phận khác nhau

Polyphenol là một trong những thành phần quan trọng nhất và chiếm tỉ lệ lớn trong thực vật nói chung. Đây là chất chống oxi hóa mạnh. Vì vậy, chỉ tiêu này khá quan trọng trong nghiên cứu hoạt tính chống oxi hóa của thực vật. Hình 1A trình bày kết quả phân tích tổng hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của phần lá, thân và rễ của cây Diệp hạ châu trồng tại Phú Yên. Kết quả cho thấy phần lá có hàm lượng polyphenol cao nhất với 217 mg GAE/g chất khô (db) tiếp theo đó là phần rễ và phần thân với hàm lượng polyphenol tương ứng là 97 và 85 mg GAE/g db. Theo Marja et al. (1999), những loại thực vật có hàm lượng polyphenol lớn hơn 20 mg GAE/g db thì có hoạt tính chống oxi hóa mạnh. Như vậy, hàm lượng polyphenol của lá, thân và rễ của cây Diệp hạ châu cao hơn giá trị khuyến cáo trên lần lượt là

10,9, 4,9 và 4,3 lần. Do đó, Diệp hạ châu có hoạt tính chống oxi hóa mạnh. Hoạt tính chống oxi hóa của Diệp hạ châu được trình bày trong hình 1B. Trong đó, phần lá thể hiện hoạt tính chống oxi hóa cao nhất (59,7%), tiếp đến là phần rễ (46%) và cuối cùng là phần thân (34,3%). Những kết quả trên cho thấy phần lá không những chiếm tỉ lệ khối lượng cao nhất mà còn có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa cao nhất. Kết quả nghiên cứu này góp phần lý giải vì sao trong sản xuất dược liệu, người ta chủ yếu dùng phần lá, trong khi đó phần thân và rễ không được sử dụng. Từ những kết quả đạt được, chúng tôi chọn phần lá để nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết nhằm thu được dịch chiết có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa cao nhất.

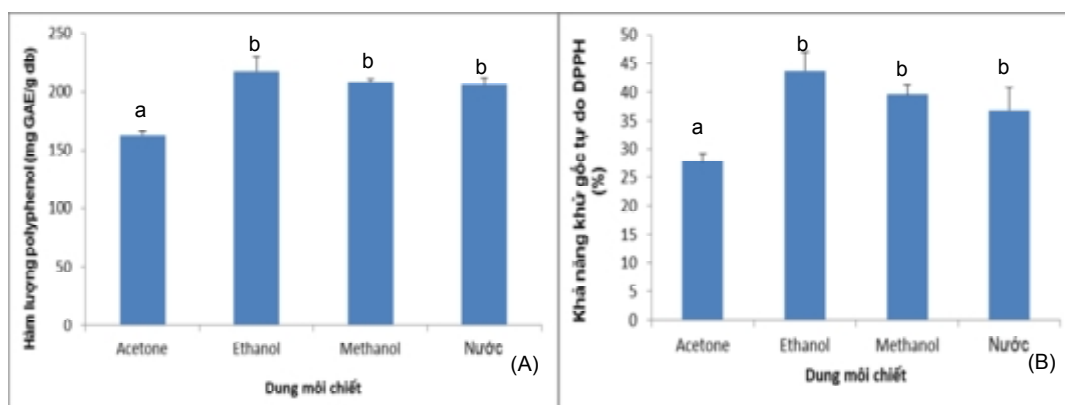
3.3. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa

Dung môi chiết là một trong những yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến hiệu quả chiết. Ảnh hưởng của các loại dung môi chiết lên hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết được thể hiện trong hình 2. Kết quả cho thấy dung môi chiết ethanol 50%, methanol 50% và nước cho hàm lượng polyphenol cao hơn đáng kể so với dung môi chiết acetone 50% ($P < 0,05$). Hàm lượng polyphenol chiết được nhờ 4 loại dung môi ethanol 50%, methanol 50%, nước



Hình 1. Hàm lượng polyphenol (A) và hoạt tính chống oxi hóa (B) của các phần trên cây Diệp hạ châu

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



Hình 2. Ảnh hưởng của dung môi chiết lên hàm lượng polyphenol (A) và hoạt tính chống oxi hóa (B) của lá Diệp hạ châu

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

và acetone 50% lần lượt là 218, 209 và 206, 163 mg GAE/g db. Kết quả phân tích cũng cho thấy không có sự khác biệt đáng kể hàm lượng polyphenol chiết được từ ba dung môi đầu ($P > 0,05$). Một xu hướng tương tự cũng được ghi nhận đối với hoạt tính chống oxi hóa (Hình 2B). Theo đó, dung môi chiết là ethanol 50%, methanol 50% và nước cho hoạt tính chống oxi hóa cao hơn acetone 50% ($P < 0,05$). Hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết acetone 50%, ethanol 50%, methanol 50% và nước lần lượt là 27,7; 43,7; 39,6 và 36,8%. Từ những kết quả đạt được chúng tôi chọn dung môi chiết là ethanol 50% cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa

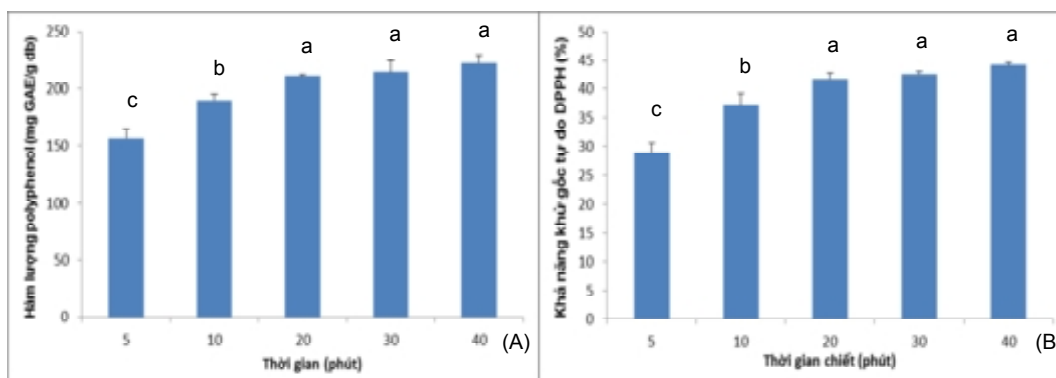
Thời gian chiết cũng là một nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình chiết. Hình 3 cho thấy ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết từ lá diệp hạ châu. Thời gian chiết ở 20, 30 và 40 phút cho hàm lượng polyphenol cao hơn đáng kể so với thời gian chiết ở 5 và 10 phút ($P < 0,05$). Khi tăng thời gian chiết từ 5 phút lên 20 phút, hàm lượng polyphenol chiết được tăng tương ứng là 157 lên 211mg GAE/mg db (Hình

3A). Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian chiết lên 30 và 40 phút, hàm lượng polyphenol tăng lên không đáng kể và không có sự khác biệt so với thời gian chiết 20 phút ($P > 0,05$). Kết quả cũng được ghi nhận tương tự đối với hoạt tính chống oxi hóa (Hình 3B). Hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết sau 5, 10, 20, 30 và 40 phút lần lượt là 28,9; 37,2; 41,8, 42,6 và 44,2%. Polyphenol là những hợp chất chống oxi hóa mạnh và có mặt phổ biến trong thực vật và chúng đóng góp chính cho hoạt tính chống oxi hóa của thực vật. Vì vậy, hàm lượng polyphenol có mối liên quan chặt chẽ với hoạt tính chống oxi hóa. Từ những kết quả đạt được chúng tôi chọn thời gian chiết là 20 phút cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa

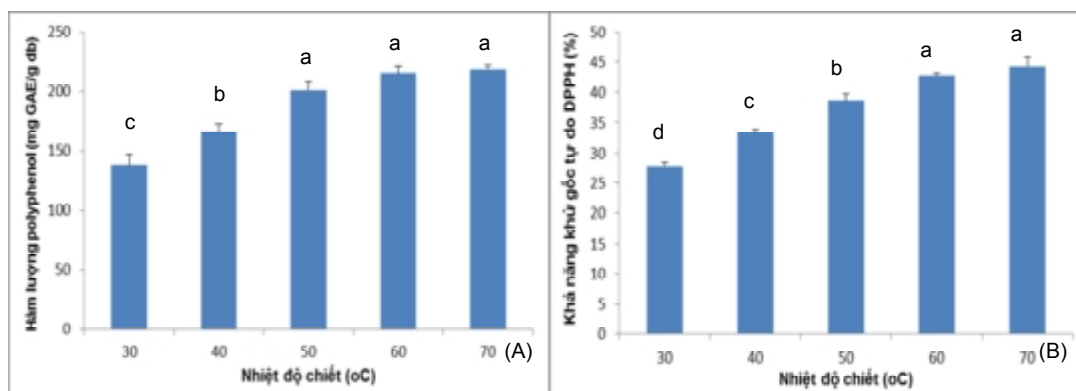
Hình 4 thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết. Hình 4A cho thấy, khi tăng nhiệt độ chiết từ 30 lên 50°C, hàm lượng polyphenol tăng lên đáng kể ($P < 0,05$), từ 138 đến 201mg GAE/g db. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên trên 60°C và 70°C, hàm lượng polyphenol gần như không tăng ($P > 0,05$). Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chống oxi hóa

Ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của cây diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) trồng tại Phú Yên



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết lên hàm lượng polyphenol (A) và hoạt tính chống oxi hóa (B) của lá Diệp hạ châu

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



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết lên hàm lượng polyphenol (A) và hoạt tính chống oxi hóa (B) của lá Diệp hạ châu

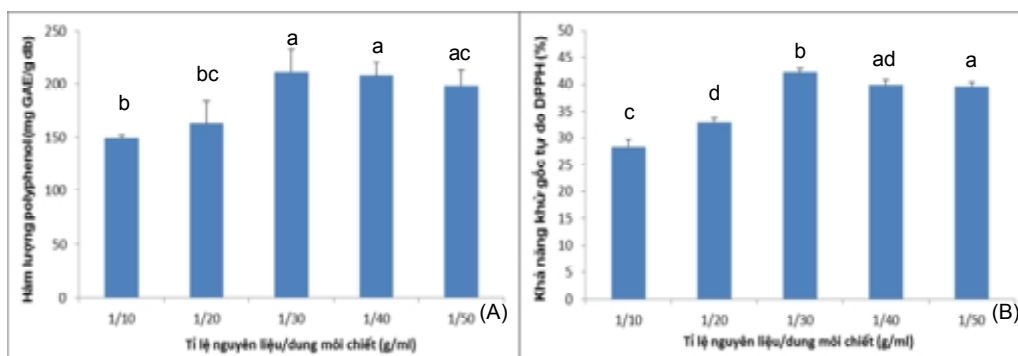
Ghi chú: Các chữ cái trên cột khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

của dịch chiết cũng được thể hiện trên hình 4B. Theo đó, một xu hướng tương tự cũng được quan sát như đối với hàm lượng polyphenol. Điều này có thể được lý giải là khi tăng nhiệt độ, khả năng khuếch tán của các chất tan ra môi trường chiết tốt hơn và vì vậy chiết được nhiều các chất có hoạt tính chống oxi hóa hơn (polyphenol nhiều hơn). Do vậy, hoạt tính chống oxi hóa cũng tăng lên. Từ những kết quả đạt được chúng tôi chọn nhiệt độ chiết là 50°C cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.6. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxi hóa

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính

chống oxi hóa được thể hiện trên hình 5. Hình 5A cho thấy tỉ lệ nguyên liệu so với dung môi chiết 1/30 (g/ml) là thích hợp cho quá trình chiết để thu được hàm lượng cao nhất polyphenol. Tỉ lệ này cho hàm lượng polyphenol (211 mg GAE/mg) cao hơn đáng kể so với chiết ở tỉ lệ 1/10 (g/ml) hoặc 1/20 (g/ml). Chiết ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/40 hoặc 1/50 (g/ml) không làm tăng đáng kể hàm lượng polyphenol ($P > 0,05$). Về hoạt tính chống oxi hóa (Hình 5B), chiết ở tỉ lệ 1/30 (g/ml) cho hoạt tính chống oxi hóa cao nhất (42,4%), chiết ở các tỉ lệ khác hoạt tính chống oxi hóa thu được thấp hơn ($P < 0,05$). Từ những kết quả đạt được chúng tôi chọn tỉ lệ chiết thích hợp là 1/30 (g/ml) cho những thí nghiệm tiếp theo.



Hình 5. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết lên hàm lượng polyphenol (A) và hoạt tính chống oxy hóa (B) của lá Diệp hạ châu

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

3.7. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết ở điều kiện chiết tối ưu

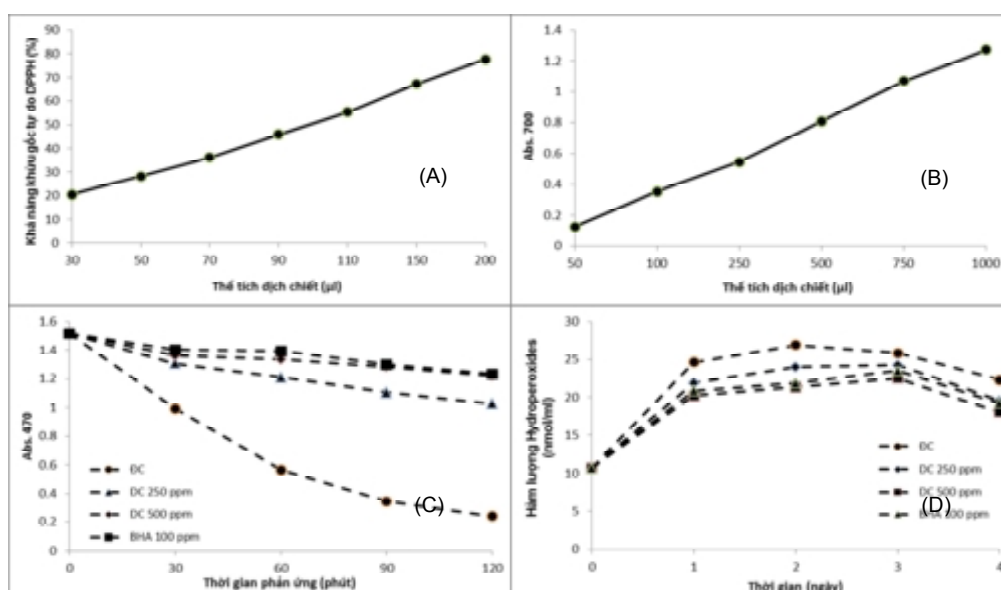
Hoạt tính chống oxy hóa của lá cây Diệp hạ châu trên *in vitro* và trên mô hình β -carotene-linoleic và dầu-nước được thể hiện trên hình 6. Hoạt tính chống oxy hóa dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH (Hình 6A) và tổng năng lực khử (Hình 6B) phụ thuộc vào hàm lượng chất chống oxy hóa có trong dịch chiết. Theo đó, khi tăng thể tích dịch chiết từ 30-200 μ l, khả năng khử gốc tự do DPPH tăng tương ứng từ 20,5-77,8%. Đối với tổng năng lực khử, khi thể tích dịch chiết tăng từ 50-1000 μ l, độ hấp thụ quang học ở 700nm (Abs. 700) tăng từ 0,1278 lên 1,2728. Giá trị Abs. 700 càng cao, tổng năng lực khử càng mạnh.

Sự giảm giá trị độ hấp thụ quang học ở bước sóng 470nm của mô hình oxy hóa β -carotene-linoleic trong sự có mặt dịch chiết lá Diệp hạ châu ở nồng độ 250ppm, 500ppm, BHA 100 ppm và mẫu đối chứng được trình bày trong hình 6C. Sự mất màu của β -carotene trong mô hình này đã được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thực vật (Madhujith and Shahidi, 2007; Wijeratne et al., 2006). Trong mô hình này, các gốc tự do tạo ra do quá trình oxy hóa axit linoleic sẽ tấn công vào các nối đôi của β -carotene làm mất màu chất này (Matthaus, 2002). Vì vậy, phương pháp này thường sử dụng để đánh giá hoạt tính của các chất chống oxy hóa

chưa biết hoặc đã biết trước (Wettasing and Shahidi, 1999). Mẫu đối chứng (ĐC) có mức độ giảm giá trị của Abs. 470 lớn nhất cho thấy β -carotene trong mẫu này bị oxy hóa mạnh nhất. Đối với các mẫu DC 250ppm và DC 500ppm, sự giảm Abs. 470 chậm hơn nhiều so với mẫu ĐC, điều đó chứng tỏ β -carotene trong các mẫu này ít bị oxy hóa hơn. Có được kết quả này là vì trong dịch chiết có chứa các chất chống oxy hóa có tác dụng trì hoãn sự oxy hóa của β -carotene. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc vào nồng độ dịch chiết. Theo đó, nồng độ dịch chiết 500ppm có tác dụng chống oxy hóa cao hơn ở 250ppm. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng ở nồng độ dịch chiết 500ppm có tác dụng chống oxy hóa tương đương BHA 100ppm.

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá Diệp hạ châu cũng được đánh giá trên mô hình dầu-nước (Hình 6D). Trong mô hình này một lần nữa cho thấy mẫu chứa dịch chiết ở nồng độ 250ppm (DC 250ppm) và 500ppm (DC 500ppm) có tác dụng trì hoãn đáng kể sự hình thành hydroperoxides so với mẫu đối chứng (ĐC). Kết quả cũng cho thấy khả năng trì hoãn sự oxy hóa chất béo trong mô hình này phụ thuộc vào nồng độ dịch chiết và ở nồng độ 500ppm có tác dụng ức chế sự hình thành hydroperoxides tương đương với BHA 100ppm.

Ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của cây diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) trồng tại Phú Yên



Hình 6. Hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết lá diệp hạ châu trong *in vitro* và trong các mô hình

4. KẾT LUẬN

Trong cây Diệp hạ châu, lá là bộ phận có hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng khử gốc tự do DPPH cao nhất với giá trị tương ứng là 217mg GAE/g db và 59,7%, tiếp theo là phần rễ với giá trị lần lượt là 97 mg GAE/g db và 46% và cuối cùng là phần thân với giá trị là 85mg GAE/g db và 34,3%.

Điều kiện tách chiết thích hợp để thu được hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của lá cây Diệp hạ châu được xác định như sau: Dung môi chiết là ethanol 50%, thời gian chiết là 20 phút, nhiệt độ chiết là 60°C và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết là 1/30 (g/ml). Hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết lá cây Diệp hạ châu thể hiện hoạt tính chống oxi hóa trên *invitro* (khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử) và trên các mô hình (mô hình β -carotene-linoleic và mô hình dầu-nước).

Những phát hiện của chúng tôi chỉ ra tiềm năng sử dụng cây Diệp hạ châu như một nguồn chiết suất chất chống oxi hóa tự nhiên để nâng cao khả năng ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng. Kết quả này có thể được xem như những báo cáo đầu tiên về hoạt tính chống oxi hóa của cây Diệp hạ châu trồng tại Phú Yên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amarowicz, R., Peggb, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84: 551-562.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74: 2157-2184.
- Fu, H., Y. and Shieh, D., E. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipid*, 9: 35-46.
- Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A. S., Babji, A. S. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology*, 8(3): 484-489.
- Jin, D. and Russell, J. M. (2010). Plant phenolic: Extraction, analysis and antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352, doi: 10.3390/molecules15107313.
- Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợp, Lưu Duẩn và Lê Doãn Diên (2002). *Hóa sinh công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.

- Marja, P. K., Anu, I. H., Heikki, J. V., Jussi-Pekka, R., Kalevi, P., Tytti, S. K., Marina, H. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3954-3961.
- Madhujith, T. and Shahidi, F. (2007). Antioxidant and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibitory of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5018-5024.
- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3444-3452.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chroma-tography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35: 771-775.
- Richards, M. P. and Hultin, H. O. (2002). Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3): 555-564.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 299: 152-78.
- Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61: 928-931.
- Wijeratne, S. S. K., Amarowicz, R., Shahidi F. (2006). Antioxidant activity of almonds and their by-products in food model systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88: 223-230.
- Wettasinghe, M. and Shahidi, F. (1999). Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1801-1812.