

KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA *IN VITRO* CỦA DỊCH CHIẾT LÁ CA CAO (*Theobroma cacao*) VÀ THỬ NGHIỆM HẠN CHẾ OXY HÓA LIPID TRÊN CƠ THỊT CÁ BỚP

Nguyễn Thị Huyền¹, Phạm Thị Kim Quyên² và Nguyễn Thế Hàn^{1*}

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường đại học Nha Trang

²Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản III Nha Trang

Email*: hannt@ntu.edu.vn

Ngày gửi bài: 08.08.2016

Ngày chấp nhận: 12.04.2017

TÓM TẮT

Cây cao cao được trồng nhiều ở các tỉnh Tây Nguyên với mục đích lấy hạt nhưng lá cao cao có chứa nhiều chất polyphenol (chất có khả năng chống oxy hóa) chưa được nghiên cứu sử dụng vào mục đích gì. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định điều kiện chiết thích hợp để thu nhận bột chiết giàu polyphenol từ lá cao cao sau đó bột chiết này được sử dụng để thử nghiệm khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp. Điều kiện chiết thích hợp được xác định như sau: dung môi chiết là 50% ethanol, nhiệt độ chiết là 75°C, thời gian chiết là 90 phút và sử dụng phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Bột 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 21,33 mg GAE/g chất khô; 0,05 mg/ml và 0,39 mg/ml. Kết quả thử nghiệm trên cơ thịt cá bớp cho thấy bột chiết lá cao cao có khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid của thịt cá xay bảo quản lạnh trong 9 ngày. Nghiên cứu này cho thấy lá cao cao là nguyên liệu tiềm năng để thu nhận bột chiết giàu polyphenol, có thể ứng dụng để ngăn ngừa sự oxy hóa lipid cho sản phẩm thủy sản.

Từ khóa: Hoạt tính chống oxy hóa, lá cao cao, điều kiện chiết, hạn chế oxy hóa lipid, cơ thịt cá bớp.

Antioxidant Activity of *Theobroma Cacao* Extract *In Vitro* and Its Effect on Lipid Oxidation of Cobia Muscles

ABSTRACT

Cacao tree (*Theobroma cacao* L.) is widely grown in the Central Highlands of Vietnam. During the harvest period, the leaves are not used for any purpose. The present study was conducted to determine the suitable extraction conditions to obtain a rich polyphenol and antioxidative extract from the cacao leaf. The dried cacao leaf extract was applied to prevent lipid peroxidation in the cobia muscles. The suitable extraction conditions were determined as follows: the extraction solvent was 50% ethanol, the extraction temperature was 75°C, the extraction time was 90 min and the extraction method was ultrasound-assisted extraction. The extract obtained under the suitable conditions had the total polyphenol level, DPPH radical scavenging activity (EC₅₀) and total reducing power (EC₅₀) of 21.33 mg GAE/g dry matter, 0.05 mg/ml and 0.39 mg/ml, respectively. The dried cacao leaf extract was effective in retarding lipid oxidation of minced cobia muscles during cold storage of 9 days. Thus, the cacao leaf extract had a potential to be used as a natural antioxidant to control lipid oxidation during the cold storage of aquatic products.

Keywords: Antioxidant activity, cacao leaf, solvent extraction, lipid oxidation prevention, cobia muscles.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Polyphenol là hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật. Nhiều bằng chứng khoa học cho thấy nhóm hợp chất này có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và kháng tế bào

ung thư (Pandey and Rizvi, 2009). 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). Thực vật là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thu nhận dịch chiết giàu polyphenol có khả năng

chống oxy hóa (Osman *et al.*, 2004; Basaga *et al.*, 1997; Kris-Etherton and Keen, 2002).

Cá bớp (*Rachycentron canadum*) là một loại cá có giá trị dinh dưỡng cao, đặc biệt có chứa nhiều axit béo không no như omega-3 và omega-6, có nhiều tác dụng tốt đối với sức khỏe con người. Theo kết quả nghiên cứu của Taheri *et al.* (2009), hàm lượng axit béo bão hòa, axit béo chưa no, omega-3(ù-3), omega-6(ù-6), tổng EPA và DHA trong cơ thịt cá bớp lần lượt là 46,01; 49,37; 8,19; 7,24; 7,53%. Tuy nhiên, với đặc điểm này mà chất lượng của cá bớp bị giảm nhanh chóng trong quá trình bảo quản sau thu hoạch. Trong quá trình bảo quản, sự oxy hóa lipid diễn ra nhanh chóng, là nguyên nhân chính làm giảm hương vị, mùi, màu sắc, cấu trúc và sinh ra các hợp chất có hại cho sức khỏe (Kanner, 1994). Để hạn chế quá trình oxy hóa lipid xảy ra trong quá trình bảo quản nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm, các chất chống oxy hóa thường được sử dụng (Kumar *et al.*, 2015). Một số hợp chất chống oxy hóa tổng hợp như butylated hydroxyl anisole (BHA) và butylated hydroxyl toluene (BHT) đã được sử dụng để bảo quản thực phẩm. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng những chất chống oxy hóa tổng hợp này có thể gây ra những tác dụng không mong muốn và gây lo ngại về sức khỏe cho người tiêu dùng (Kahl and Kappus, 1993; Faine *et al.*, 2006). Chính vì thế, việc nghiên cứu các hợp chất chống oxy có nguồn gốc từ tự nhiên, không độc hại đối với sức khỏe người sử dụng, đang được nhiều nhà khoa học và nhà sản xuất quan tâm.

Cây cao có tên khoa học là *Theobroma cacao*, là cây công nghiệp nhiệt đới, được trồng ở nhiều nơi trên thế giới. Ở Việt Nam, cây cao được trồng nhiều tại các tỉnh Tây Nguyên (Nguyễn Tài Sum, 1996). Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, cây cao thường xuyên được cắt cành, tỉa tán để đảm bảo độ râm cần thiết. Lượng lá cây được tỉa đó chưa được sử dụng cho bất cứ mục đích gì. Những nghiên cứu trước đây chỉ chủ yếu tập trung vào đánh giá hoạt tính sinh học của quả cao (Lee *et al.*, 2003). Theo Osman *et al.* (2004), dịch chiết từ lá cao thu hoạch tại Malaysia có khả năng chống oxy hóa mạnh. Cho đến nay, chưa có công trình nghiên

cứu nào được thực hiện để thu nhận và ứng dụng dịch chiết polyphenol có khả năng chống oxy hóa từ lá cao trồng tại Việt Nam.

Do đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm: xác định điều kiện chiết thích hợp để thu nhận dịch chiết giàu polyphenol có khả năng chống oxy hóa từ lá cao và thử nghiệm sử dụng dịch chiết thu được để hạn chế sự oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Lá cao cao

Lá cao cao sử dụng trong nghiên cứu được thu hái trực tiếp tại vườn trồng của người dân ở tỉnh Gia Lai vào tháng 3/2015. Nguyên liệu được sấy khô ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 12 giờ, tới độ ẩm khoảng 10%. Nguyên liệu khô được nghiền nhỏ bằng máy nghiền (Super Blender, MXT2GN, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd, Nhật Bản) và sàng qua lưới sàng có đường kính 0,1 mm. Bột nguyên liệu 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

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), axit gallic, thuốc thử Folin-Ciocalteu, potassium ferricyanide ($K_3Fe[CN]_6$), aluminium chloride ($AlCl_3$), sodium carbonate (Na_2CO_3), trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), epigallocatechin gallate (EGCG), cloroform được cung cấp bởi công ty Sigma Aldrich (Hoa Kỳ). Các hóa chất và thuốc thử khác sử dụng trong nghiên cứu đều đạt hạng phân tích.

2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện chiết

Trong nghiên cứu này, phương pháp nghiên cứu đơn yếu tố được sử dụng. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả nghiên cứu của các thí nghiệm trước. Nghiên cứu đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết (ethanol/nước) (0, 25, 50, 75 và 100%), nhiệt độ chiết (30, 45, 60, 75 và 90°C) và thời gian chiết (10, 30, 60, 90 và 120 phút). Trong các thí nghiệm này tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết là 1/50 (g/ml) được giữ cố định.

Khả năng chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết lá ca cao (*Theobroma cacao*) và thử nghiệm hạn chế oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp

Để đánh giá ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hiệu quả chiết polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của lá ca cao, 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. Điều kiện chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm như sau: mẫu được chiết trong bể siêu âm S15-S900H (Elma Co., Đức) với tần số của sóng siêu âm là 37 Hz.

Trong tất cả các thí nghiệm trên, sau khi kết thúc quá trình chiết, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Qualitative No.103. Dịch chiết sau khi lọc được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không (R210, Buchi, Thụy sĩ) ở nhiệt độ 40°C và áp suất chân không là 123 mBar. Bột chiết thu được sau cô quay được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.4. Thử nghiệm khả năng hạn chế oxy hóa lipid của thịt cá bớp bằng bột chiết lá ca cao

Cá bớp được mua tại cảng Hòn Rớ (Nha Trang, Khánh Hòa). Cá được bảo quản lạnh bằng nước đá trong thùng xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tiếp theo, cá được xử lý và xay nhuyễn bằng máy xay để tiến hành nghiên cứu. Nhóm 1 được trộn với nước cất (ĐC), nhóm 2, 3 được trộn với dung dịch bột chiết lá ca cao có nồng độ lần lượt là: 8,9 mg/ml (C1) và 17,8 mg/ml (C2), nhóm 4 trộn với EGCG nồng độ 8,9 mg/ml (EGCG). Trong tất cả các trường hợp trên, tỉ lệ dung dịch bột chiết, nước cất, dung dịch EGCG so với thịt cá là 1/20 (ml/g). Sau khi trộn với dung dịch bột chiết, thịt cá được đồng hóa bằng máy đồng hóa (IKA, T18B, Ultra - Turax, Germany). Cuối cùng thịt cá được bảo quản lạnh trong hộp nhựa ở nhiệt độ 4°C. Sau 0, 3, 6 và 9 ngày bảo quản, tiến hành lấy mẫu và đánh giá sự oxy lipid.

2.5. Phương pháp phân tích

2.5.1. 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 dung dịch bột chiết

trộn với 0,9 ml nước cất. Sau đó cho thêm 1 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và 2,5 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 độ hấp thụ quang ở bước sóng 760 nm. Axit gallic được dùng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu diễn bằng miligam axit gallic tương đương (mg GAE)/g nguyên liệu khô.

2.5.2. 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: 1 ml dung dịch bột chiết pha trong 50% ethanol được cho vào ống nghiệm, sau đó thêm 0,5 ml dung dịch đệm phosphate (pH 6,6) và 0,5 ml dung dịch $\text{K}_3(\text{Fe}[\text{CN}]_6)$ 1%. Hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó thêm 0,5 ml dung dịch TCA 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 đo ở bước sóng 700 nm. Kết quả được thể hiện bằng giá trị EC_{50} (là nồng độ dung dịch bột chiết cho độ hấp thụ quang là 0,5).

2.5.3. Xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo phương pháp của Fu và Shieh (2002) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Bột chiết được pha loãng trong 50% ethanol 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%) vào hỗn hợp, lắc đều và giữ hỗn hợp trong bóng tối trong thời gian 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:

$$\text{Khả năng khử gốc tự do DPPH (\%)} = 100 \times (\text{ACT} - \text{ASP})/\text{ACT}.$$

Trong đó, ACT: Độ hấp thụ quang học của mẫu trắng không chứa dung dịch bột chiết; ASP: Độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa dung dịch bột chiết. Kết quả báo cáo bởi giá trị EC_{50} là nồng độ của dung dịch bột chiết cho khả năng khử gốc tự do DPPH là 50%.

2.5.4. Xác định chỉ số Peroxide

Chỉ số peroxide (PV) được xác định theo phương pháp của Richard và Hultin (2002) với một vài thay đổi nhỏ. Lấy 100 µl dầu, sau đó thêm 1.900 µl hỗn hợp chloroform và methanol (1:1, v/v) và 10 µl hỗn hợp NH₄SCN 30% và FeCl₂, tiếp tục giữ hỗn hợp thêm 10 phút trước khi đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 300 nm. Hàm lượng HPO được xác định từ đường chuẩn Cumene hydroperoxide (Bligh and Dyer, 1959).

2.5.5. Xác định chỉ số TBARS

Chỉ số TBARS được xác định theo phương pháp của Lemon (1975) với một vài hiệu chỉnh nhỏ. Khoảng 5 g thịt cá bớp đã được xay nhuyễn trộn với 10 ml dung dịch TCA 7,5% và tiến hành chiết trong thời gian 10 phút, sau đó lọc qua giấy lọc Qualitative No.103. Phần dịch lọc được trộn với dung dịch TBA 0,02 M theo tỷ lệ thể tích bằng nhau để đạt 10 ml trong ống nghiệm và giữ ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 30 phút. Sau đó làm nguội dưới vòi nước chảy đến nhiệt độ phòng trước khi xác định độ hấp thụ quang học ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng Malonaldehyde (MAD) được tính toán từ đường cong chuẩn được xây dựng với nồng độ MAD từ 0,01 - 0,05 µM. Kết quả được báo cáo là µM MAD/kg thịt cá.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (mean ± SD). Phần mềm Microsoft Excel 2007 được sử dụng để tính toán số liệu và vẽ đồ thị. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm (SPSS) Statistical Package for the Social Sciences 16.0. 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 nồng độ dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa

Với mục đích thu nhận dịch chiết để sử dụng trong thực phẩm, hỗn hợp ethanol trong

nước được sử dụng để nghiên cứu. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết (ethanol/nước) đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của lá ca cao được trình bày ở hình 1. Kết quả cho thấy nồng độ dung môi chiết ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các hợp chất polyphenol và khả năng chống oxy hóa. Khi tăng nồng độ ethanol từ 0 - 50% thì hàm lượng polyphenol tổng số tăng lên từ 0,77 - 14,73 mg GAE/g nguyên liệu khô. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 100% thì hàm lượng polyphenol có xu hướng giảm xuống. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây trên các đối tượng thực vật khác nhau. Samuagam *et al.* (2013) nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hiệu suất chiết polyphenol trên vỏ của chôm chôm (*Nephelium lappaceum*), măng cụt (*Garcinia mangostana*) và bòn bòn (*Lansium domesticum*). Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol tăng dần theo sự tăng lên của nồng độ dung môi ethanol/nước trong dải từ 0 - 80%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ ethanol lên 100% thì hiệu suất chiết giảm đáng kể. Radojković *et al.* (2010) nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết (ethanol/nước) đến hàm lượng polyphenol tổng số của lá dâu tằm và 68,30% được xác định là nồng độ thích hợp để chiết polyphenol.

Xu hướng ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến khả năng chống oxy hóa tương tự như đối với hàm lượng polyphenol tổng số. Theo đó, năng lực khử của dung dịch bột chiết từ lá ca cao tăng lên cùng với sự tăng của nồng độ ethanol trong dải từ 0 - 50% (Hình 1-B). Khi nồng độ ethanol tăng lên 100% thì năng lực khử giảm mạnh. Giá trị EC₅₀ của dung dịch bột chiết với dải nồng độ 0, 25, 50, 75 và 100% tương ứng là 2,35; 1,51; 0,69; 0,76 và 2,30 mg/ml.

Xu hướng ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến khả năng khử gốc tự do DPPH tương tự như năng lực khử. Tại cùng nồng độ dung dịch bột chiết 0,2 mg/ml, khi nồng độ ethanol tăng từ 0 lên 50% thì khả năng khử gốc tự do DPPH tăng từ 8,63 đến 67,91%. Khả năng khử gốc tự do DPPH giảm nhẹ ở nồng độ 75% ethanol, còn 51,22% và giảm mạnh còn 15,43% ở nồng độ

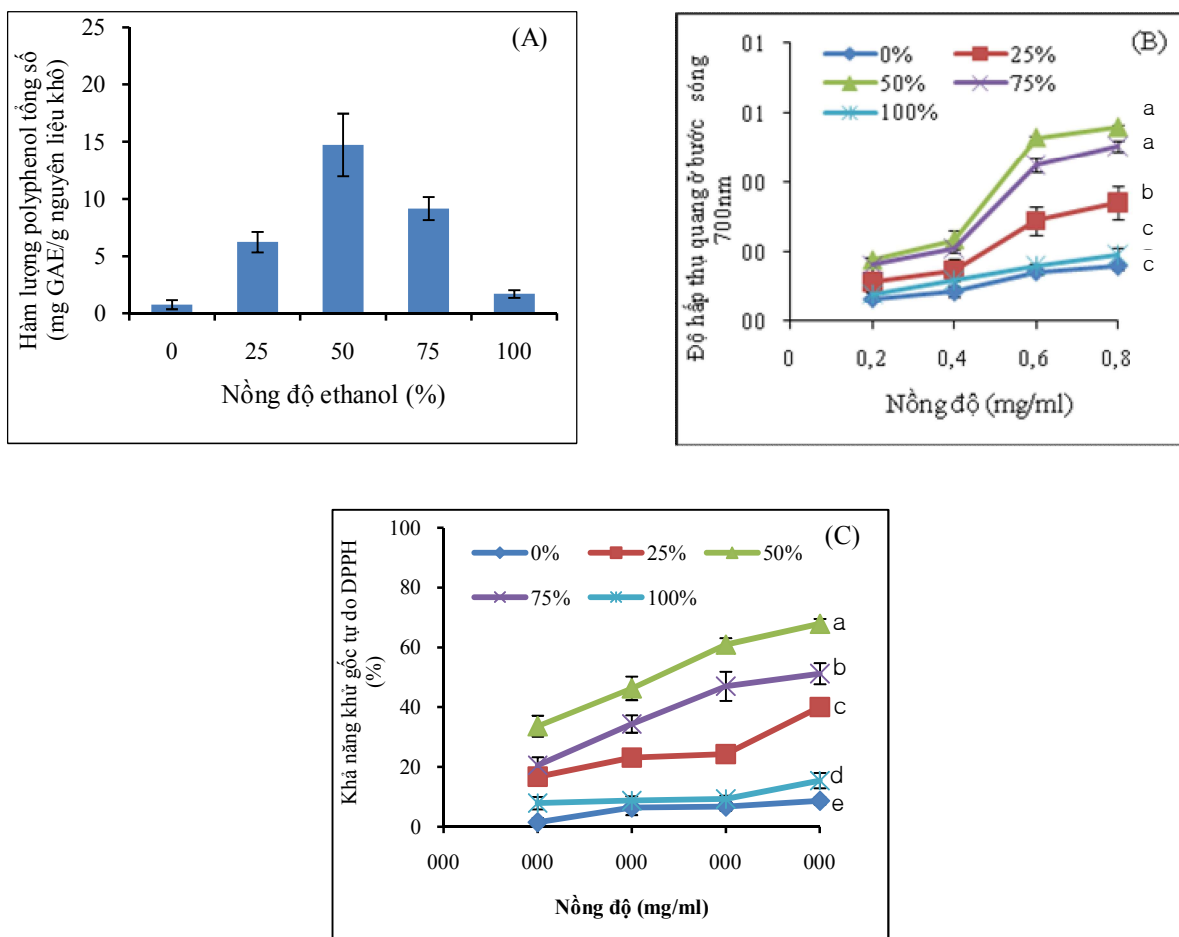
Khả năng chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết lá ca cao (*Theobroma cacao*) và thử nghiệm hạn chế oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp

100% ethanol (Hình 1-C). Giá trị EC_{50} của dung dịch bột chiết trong dải nồng độ ethanol 0, 25, 50, 75 và 100% lần lượt là 0,98; 0,37; 0,12, 0,19 và 0,86 mg/ml. Ở nồng độ 50% và 75% ethanol thì không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Theo báo cáo của Emanuel *et al.* (2011) nghiên cứu trên trà Atiso (*Cynarae folium*), nồng độ ethanol tăng từ 25 đến 75% thì khả năng chống oxy hóa tăng, tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 97% thì khả năng chống oxy hóa giảm. Kết quả tương tự cũng được Samuagam *et al.* (2013) nghiên cứu trên vỏ của chôm chôm (*Nephelium lappaceum*), măng cụt (*Garcinia mangostana*) và bòn bòn (*Lansium domesticum*). Theo đó, khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dung dịch bột chiết từ 3 loại vỏ trên tăng dần theo sự tăng của

nồng độ ethanol từ 0 - 80%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ ethanol từ 80 - 99,5% thì khả năng chống oxy hóa giảm mạnh.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của lá ca cao được trình bày ở hình 2. Khi nhiệt độ chiết tăng từ 30 - 75°C thì hàm lượng polyphenol tăng đều từ 3,98 - 15,10 mg GAE/g nguyên liệu khô. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 90°C thì hàm lượng polyphenol giảm nhẹ xuống 12,22 mg GAE/g nguyên liệu khô. Kết quả này có thể được giải thích như sau: khi tăng



Hình 1. 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)

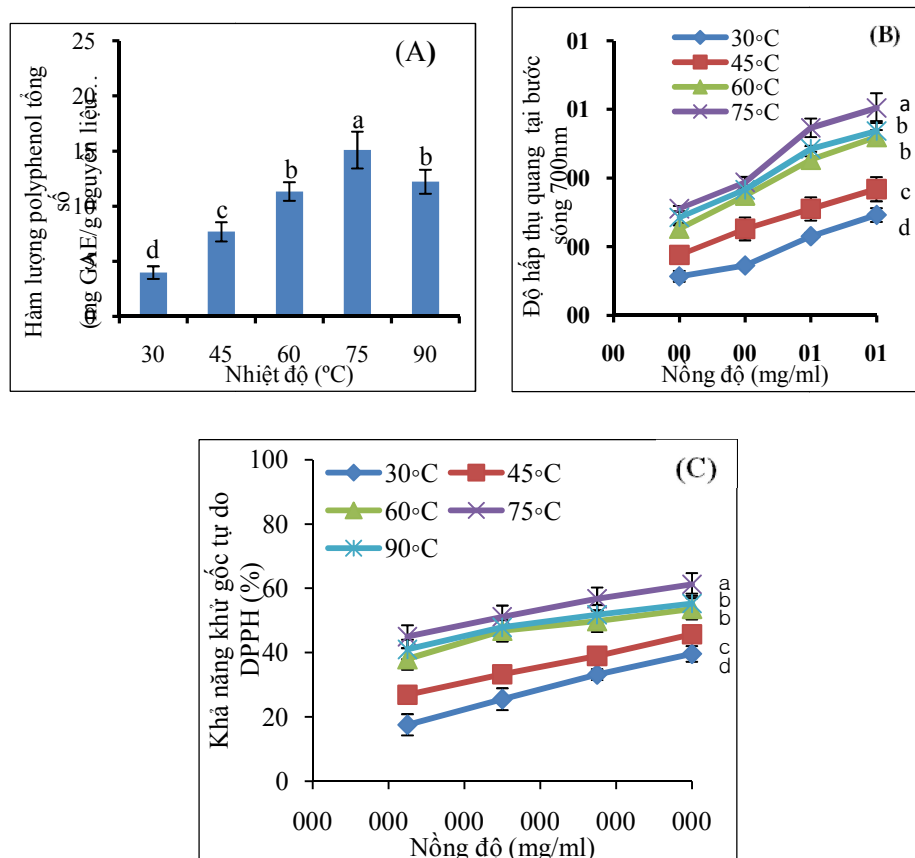
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đồ thị chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

nhệt độ sẽ làm tăng khả năng hòa tan của chất tan và hệ số khuếch tán, độ nhớt của dung môi giảm, do đó sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết. Tuy nhiên, khi nhiệt độ chiết tăng quá cao thì có thể làm phá hủy các hợp chất polyphenol, đặc biệt là những chất không bền với nhiệt độ cao (Liyana *et al.*, 2005; Spigno *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009; Chew *et al.*, 2011). Do đó, khi tăng nhiệt độ lên 90°C, hiệu quả chiết polyphenol giảm đáng kể so với nhiệt độ 75°C (Hình 2).

Bột chiết thu được ở các nhiệt độ chiết khác nhau, tại cùng nồng độ 0,8 mg/ml thì năng lực khử tăng đáng kể từ 0,29 đến 0,52 khi nhiệt độ chiết tăng từ 30 đến 60°C. Tiếp tục tăng nhiệt độ lên 75°C, năng lực khử tăng mạnh và đạt 0,60. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên 90°C thì năng lực khử giảm nhẹ còn 0,54 (Hình 2-B). Giá trị EC₅₀ của dung dịch bột chiết khi chiết ở các

nhệt độ 30, 45, 60, 75 và 90°C lần lượt là 1,56; 1,28; 0,76; 0,56 và 0,70 mg/ml.

Xu hướng ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH tương tự như năng lực khử. Tại cùng 1 nồng độ dung dịch bột chiết 0,1 mg/ml, khi nhiệt độ chiết tăng từ 30 lên 60°C thì khả năng khử gốc tự do DPPH tăng từ 39,59 đến 53,61%. Khả năng khử gốc tự do DPPH tăng lên 61,22% ở nhiệt độ 75°C, và giảm nhẹ còn 55,27% ở nhiệt độ 90°C (Hình 2-C). Giá trị EC₅₀ của dung dịch bột chiết từ lá ca cao ở các nhiệt độ chiết 30, 45, 60, 75 và 90°C lần lượt là 0,18; 0,17; 0,08; 0,05 và 0,07 mg/ml. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu khả năng chống oxy hóa từ dịch chiết rau má của Chew *et al.* (2011). Khi nhiệt độ chiết tăng từ 25-65°C thì khả năng chống oxy hóa của dịch chiết tăng. Khi tăng nhiệt độ chiết lên 90°C thì khả năng chống oxy hóa giảm.



Hình 2. 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)

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

3.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của lá ca cao được mô tả trong hình 3. Kết quả cho thấy thời gian chiết ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng các hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa. Khi thời gian chiết tăng từ 10 lên 60 phút thì hàm lượng polyphenol tăng mạnh từ 4,81 đến 14,02 mg GAE/g nguyên liệu khô. Khi tiếp tục tăng thời gian chiết lên 90 và 120 phút thì hàm lượng polyphenol tổng số lượt là 18,58 và 19,34 mg GAE/g nguyên liệu khô, nhưng không có sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Sự ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu quả chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học phụ thuộc vào đặc tính của nguyên liệu và hợp chất cần chiết. Trong nghiên cứu này, 90 phút là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình chiết các hợp chất polyphenol từ lá ca cao. Khi tiếp tục tăng thời gian chiết, hàm lượng polyphenol tổng số thu được không thay đổi đáng kể. Do đó, thời gian chiết 90 phút là phù hợp.

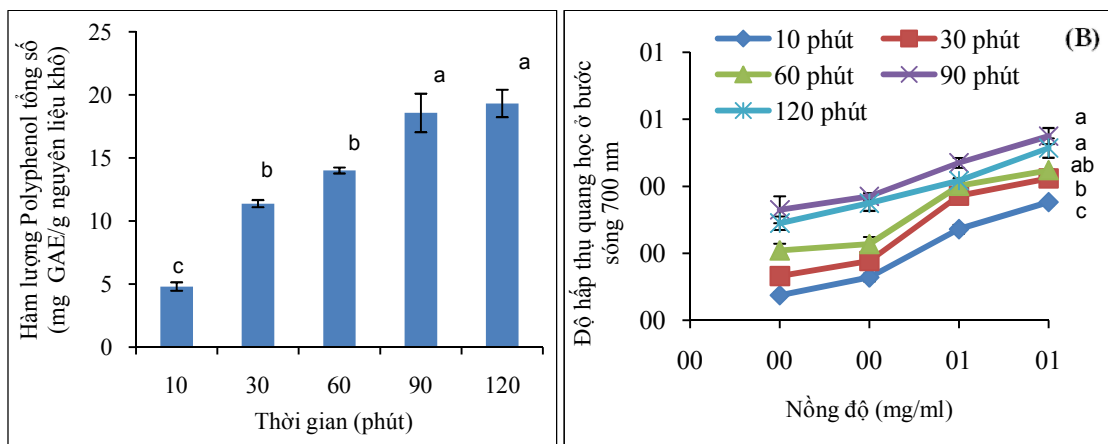
Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết đến năng lực khử và khả năng khử gốc tự do DPPH của dung dịch bột chiết lá ca cao cho thấy tổng năng lực khử tăng lên cùng với sự tăng lên của thời gian chiết 10 đến 60 phút (Hình 3-B và 3-C). Tổng năng lực khử tại nồng độ 0,8 mg/ml của dung dịch bột chiết ở 10 phút là 0,35; trong khi đó, giá trị này ở 60 phút

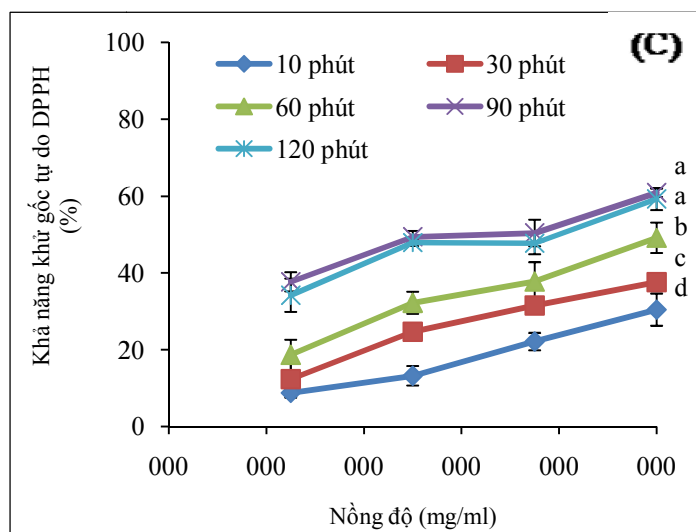
là 0,45. Tổng năng lực khử tiếp tục tăng khi thời gian tăng đến 90 phút (0,55) và giảm nhẹ khi tăng đến 120 phút (0,51). Giá trị EC_{50} của dung dịch bột chiết ở các thời gian chiết 10, 30, 60, 90 và 120 phút tương ứng là 1,04; 1,02; 0,92; 0,70 và 0,89 mg/ml.

Xu hướng ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH tương tự như năng lực khử. Tại nồng độ dung dịch bột chiết 0,1 mg/ml, khi thời gian chiết tăng từ 10 lên 60 phút thì khả năng khử gốc tự do DPPH tăng từ 30,40 đến 49,14%. Khả năng khử gốc tự do DPPH tăng lên 60,91% tại thời gian là 90 phút và giảm nhẹ còn 59,27% ở 120 phút (Hình 3-B). Giá trị EC_{50} của dung dịch bột chiết lá ca cao trong dải thời gian chiết 10, 30, 60, 90 và 120 phút lần lượt là: 0,21; 0,19; 0,14; 0,07 và 0,08 mg/ml. Drużyńska *et al.* (2007) công bố kết quả tương tự khi nghiên cứu khả năng chống oxy hóa của dịch chiết trà xanh. Khả năng chống oxy hóa tăng khi thời gian chiết tăng từ 15 - 60 phút.

3.4. Ảnh hưởng của sóng siêu âm đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa

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, dung dịch bột chiết thu được bằng phương pháp chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm có hàm lượng polyphenol tổng số là 21,33 mg GAE/g nguyên liệu khô; trong khi đó hàm lượng trong dung dịch bột chiết theo phương pháp chiết thường





Hình 3. 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)

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

là 13,67 mg GAE/g nguyên liệu khô (Hình 4). Sóng siêu âm tạo ra hiệu ứng vật lý và cơ học, dẫn đến phá vỡ màng tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho dung môi thâm nhập vào bên trong nguyên liệu và làm tăng sự khuếch tán của các hợp chất polyphenol vào dung môi (Jing *et al.*, 2008).

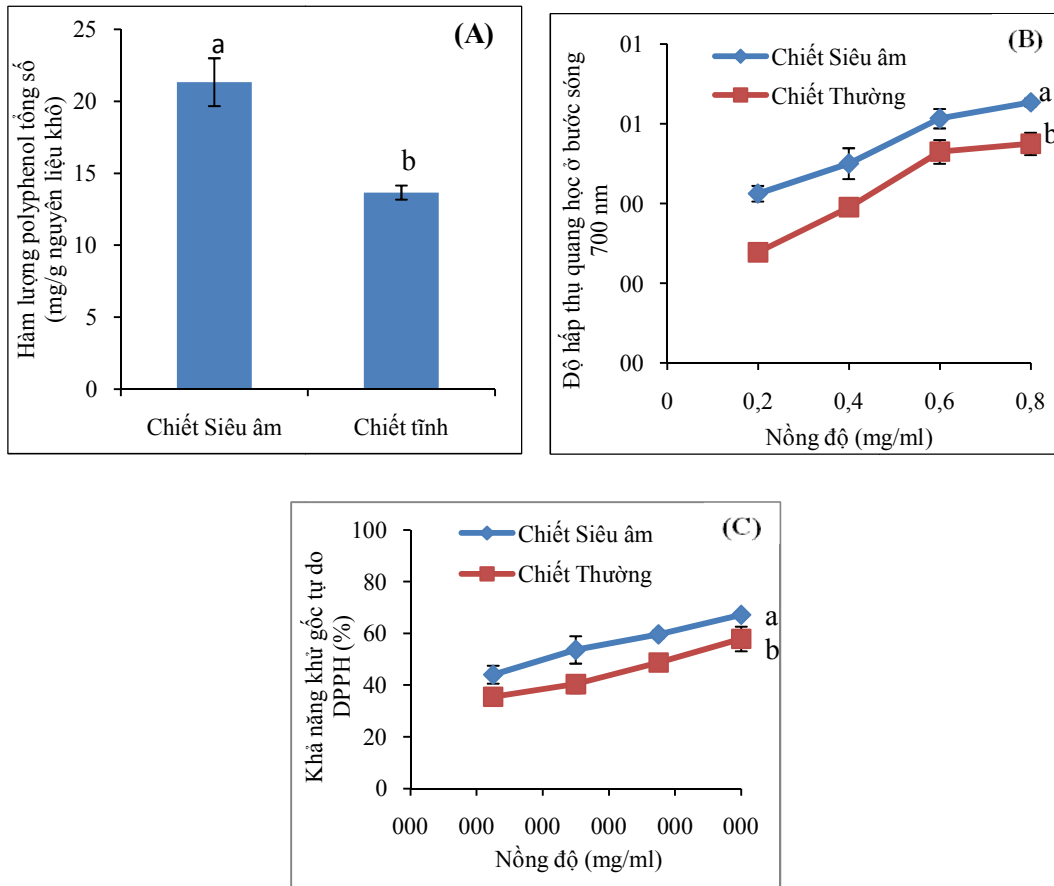
Xu hướng ảnh hưởng của sóng siêu âm đến khả năng chống oxy hóa của dung dịch bột chiết cũng tương tự như hàm lượng các hợp chất polyphenol (Hình 4-B và 4-C). Đối với năng lực khử, giá trị EC_{50} của dung dịch bột chiết có sử dụng sóng siêu âm và không sử dụng sóng siêu âm lần lượt là 0,39 và 0,66 mg/ml. Đối với khả năng bắt gốc tự do DPPH, giá trị EC_{50} của dung dịch bột chiết có sử dụng sóng siêu âm và không sử dụng sóng siêu âm lần lượt là 0,05 và 0,09 mg/ml.

3.5. Khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp trong quá trình bảo quản lạnh của dung dịch bột chiết lá ca cao

Oxy hóa lipid là một quá trình diễn ra phức tạp, kết quả là tạo ra các sản phẩm khác nhau. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch bột chiết lá ca cao đến khả năng hạn chế quá trình oxy hóa lipid của cơ thịt cá bớp được nghiên cứu dựa vào

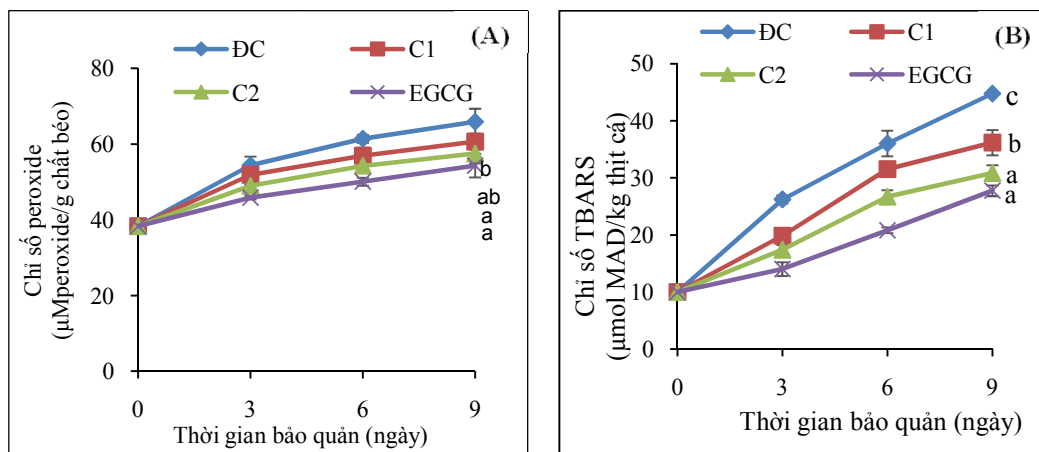
chỉ số PV (sản phẩm sơ cấp) và chỉ số TBARS (sản phẩm thứ cấp) (Hình 5). Kết quả thu được thể hiện lần lượt trên Hình 5-A và 5-B. Theo thời gian bảo quản lạnh, chỉ số PV của tất cả các mẫu tăng liên tục (Hình 5-A). Tuy nhiên, các mẫu cá được xử lý với dung dịch bột chiết chứa polyphenol có hàm lượng PV nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với mẫu không xử lý (mẫu đối chứng) và mẫu có xử lý bằng chất chống oxy hóa thương mại (EGCG). Sau thời gian thí nghiệm 9 ngày ở nhiệt độ 4°C, chỉ số PV của mẫu ĐC là 66,88 μM hydroperoxide/g chất béo; các mẫu C1, C2 và EGCG lần lượt là 61,66; 57,11; 54,35 μM hydroperoxide/g chất béo. Tương tự sự biến đổi của chỉ số PV, chỉ số TBARS của tất cả các mẫu tăng theo thời gian bảo quản (Hình 5-B). Các mẫu có xử lý với dung dịch bột chiết polyphenol và chất chống oxy hóa thương mại (EGCG) có hàm lượng TBARS thấp hơn nhiều ($p < 0,05$) so với mẫu đối chứng. Sau 9 ngày bảo quản lạnh, hàm lượng TBARS của mẫu đối chứng là 44,76 μmol MAD/kg thịt cá, trong khi đó hàm lượng TBARS của các mẫu C1, C2 và EGCG lần lượt là 36,17; 30,84 và 27,75 μmol MAD/kg thịt cá. Kết quả này có thể được giải thích như sau, dung dịch bột chiết lá ca cao có chứa một hàm lượng đáng kể các hợp chất

Khả năng chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết lá ca cao (*Theobroma cacao*) và thử nghiệm hạn chế oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp



Hình 4. 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) của dung dịch bột chiết lá ca cao

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



Hình 5. Sự thay đổi chỉ số PV (A) và TBARS (B) của thịt cá bớp trong thời gian bảo quản lạnh ở nhiệt độ 4°C

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đồ thị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC: Mẫu đối chứng, C1, C2: Lần lượt là mẫu cá bảo quản bằng dung dịch bột chiết ở nồng độ 8,9 và 17,8 mg/ml, EGCG: Mẫu cá bảo quản bằng EGCG ở nồng độ 8,9 mg/ml.

polyphenol. Các hợp chất này đã được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa tốt với khả năng khử gốc tự do bằng cách nhường một nguyên tử hydro hay điện tử và hạn chế sự hình thành của hydroperoxide (Kondo *et al.*, 1999; Marinova *et al.*, 2006). Mặt khác, các chất này còn có khả năng khóa các ion kim loại như Fe^{2+} và Cu^{2+} , các ion kim loại này có khả năng xúc tác quá trình oxy hóa lipid (Yamamoto, 1991). Ngoài ra, các hợp chất polyphenol còn có khả năng kìm hãm hoạt động của các enzyme tạo ra các gốc tự do như xanthine oxydase bằng cách liên kết với các kim loại trong trung tâm hoạt động của enzyme. Như vậy, dung dịch bột chiết lá ca cao giàu polyphenol có khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid của cơ thịt cá bóp. Kết quả này cho thấy tiềm năng lớn trong việc sử dụng dung dịch bột chiết này để bảo quản cá bóp sau thu hoạch.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định được điều kiện chiết thích hợp để thu nhận dung dịch bột chiết giàu polyphenol có khả năng chống oxy hóa từ lá ca cao gồm: dung môi ethanol/nước 50%, nhiệt độ chiết 75°C, thời gian chiết là 90 phút và chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Dung dịch bột chiết giàu polyphenol từ lá ca cao có khả năng hạn chế sự oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bóp. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng lớn trong việc sử dụng dung dịch bột chiết lá ca cao để hạn chế sự thay đổi chất lượng của nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm trong quá trình bảo quản. Tuy nhiên, để có thể áp dụng vào thực tế, bên cạnh khả năng ngăn ngừa sự oxy hóa lipid những nghiên cứu tiếp theo cần đánh giá chất lượng cảm quan của mẫu bảo quản bằng dung dịch bột chiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Basaga, H., Tekkaya, C., Acikel, F. (1997). Antioxidative and Free Radical scavenging Properties of Rosemary Extract. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technology*, 30: 105-108.
- Blight, E.G., Dyer, W.S. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Central Journal of Biochem and physiol.*, 37: 911-917.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, S.P., Lianto, F.S. (2009). Effect of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 11: 166-172.
- Chew, K. K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan, Aida, W.M., 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.
- Drużyńska, B., Stepnińska, A., Wołosiak, R., (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenol from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6: 27-36.
- Emanuel, V., Adrian, V., Nijta Sultan, Svetlana, C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of *Cynara Scolymus* (Cynarae folium, Asteraceae Family). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10: 777-783.
- Fu, H., Shieh, D., Ho, C. 2002. Antioxydant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipid*, 9: 35-46.
- Fu, L., Xu, B.T., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xu, X. R., Xia, E. Q. (2011). Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 2112-2124.
- Jing, W.R., Baoguo S, Yanping, C., Yuan, T., Xuehong, L. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106: 4-10.
- 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: 329-338.
- Kanner. (1994). Oxidative processes in meat and meat product quality implications. *National Center for Biotechnology Information*, 3: 169-189.
- Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., Toyoda, M. (1999). Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362: 79-86.
- Kris-Etherton, P.M., Keen, C.L. (2002). Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current Opinion in Lipidology*, 13: 41-49.

Khả năng chống oxy hóa *in vitro* của dịch chiết lá ca cao (*Theobroma cacao*) và thử nghiệm hạn chế oxy hóa lipid trên cơ thịt cá bớp

- 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. *Journal of the American Medical Association*, 296: 1255-1265.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7292-7295.
- Lemon, D.W. (1975). An improved TBA test for rancidity. *New Series Circular*, pp.51-52.
- Liyana, P.C., Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 9: 47-56.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V., Toneva, A.G. (2006). Antioxidant activity and mechanism of action of ferulic and caffeic acids in different lipid systems. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 83: 6-13.
- Nguyễn Tài Sum (1996). Cây ca cao và triển vọng ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.210-211.
- Osman, H., Fan, L.S. (2004). The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *Food Chemistry*, 38: 315-321.
- Osman, H., Nasarudin, Lee, L.S. (2004). Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidant potential. *Food Chemistry*, 86: 41 - 46.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxidant activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokukhin Kogyo Gakkaishi*, 3: 771-775.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenol as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2: 270-278.
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S. (2010). Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM). *Romanian Biotechnological Letters*, 17: 7295-7308.
- Richards, M.P., Hultin, H.O. (2002). Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 555-564.
- Samuagam, L., Sia, C.M., Akowuah, G.A., Okechukwu, P.N., Yim, H.S. (2013). The effect of extraction conditions on total phenolic content and free radical scavenging capacity of selected tropical fruits peel. *Health and the Environment Journal*, 4: 80-102.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela, R.M.M. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Cialteu reagent. *Methods in Enzymology*, 29: 152-178.
- Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D.M. (2007). Effects of extract time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolic. *Journal of Food Engineering*, 8: 200-208.
- Taheri, S., Motallebi, A. A., Fazlara, A., Aghababayan, A., Aftabsavar, Y. (2012). Changes of fatty acid profiles in fillets of Cobia (*Rachycentron canadum*) during frozen storage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11: 204-213.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review on polyphenol in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423-447.
- Yamamoto, S. (1991). Mammalian lipooxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1128: 117-131.