

ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA TỪ CÂY LÁ ĐẮNG (*VERNONIA AMYGDALINA*)

La Thị Hiền¹, Trần Thị Minh Nhung², Nguyễn Thùy Trang³, Đỗ Mai Nguyên Phương⁴

^{1, 2, 3, 4} Trường Đại học Công Nghiệp Thực Phẩm Tp. Hồ Chí Minh

⁴phuongdmn@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 01/8/2017; Ngày duyệt đăng: 05/9/2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác lập các điều kiện trong quá trình trích ly các chất chống oxy hóa từ lá đắng (*Vernonia amygdalina*) bằng dung môi nước. Sự ảnh hưởng của các yếu tố tỷ lệ nguyên liệu: dung môi thời gian và nhiệt độ lần lượt được khảo sát. Mẫu lá đắng được trích ly ở tỷ lệ nguyên liệu: dung môi (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50), thời gian (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 phút) và nhiệt độ (50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C). Kết quả mỗi thí nghiệm được đánh giá thông qua ba hàm mục tiêu: hàm lượng polyphenol tổng (TPC), hàm lượng flavonoid tổng (TFC) và hoạt tính kháng oxy hóa qua khả năng trung hòa gốc tự do (DPPH) của dịch chiết thu được. Nghiên cứu chỉ ra rằng, điều kiện trích ly lá đắng (*Vernonia amygdalina*) ở 70°C trong 40 phút với tỉ lệ 1:30 sẽ cho hiệu suất trích ly cao nhất về 3 hàm mục tiêu TPC, TFC và DPPH (lần lượt là 451,784 ± 1,995 mg GAE/100g; 41,735 ± 0,791 mg QE/100g; 96,536 ± 2,920 ppm VitC).

Từ khóa: lá đắng, *vernonia amygdalina*, trích ly, polyphenol tổng, flavonoid tổng, hoạt tính kháng oxy hóa

ABSTRACT

Effect of extraction on total polyphenol content and antioxidant activity of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*)

This study examines conditions of the extraction of antioxidants from bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) using water. The effects of temperature, time, and solid-solvent ratio on extraction were studied. The bitter leaf sample was extracted in water at three solid-solvent ratios (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50), for various lengths of time (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min), and at various temperatures (50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C). The result of each experiment was evaluated by total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity (DPPH) resulting from water extraction of bitter leaf. The study shows that the best combination of extraction conditions for the bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) was at 70°C for 40 min with 1:30 solid-solvent ratio, obtaining levels of TPC, TFC and DPPH (451.784 ± 1.995 mg GAE/100g, 41.735 ± 0.791 mg QE/100g, 96.536 ± 2.920 ppm VitC, respectively). The experiments and results are presented in this paper.

Keywords: bitter leaf, *Vernonia amygdalina*, extraction, total polyphenol, total flavonoid, antioxidant activity.

1. Giới thiệu

Trong khoảng hai thập kỷ gần đây, gốc tự do và chất chống oxy hóa là mối quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học nói riêng và xã hội nói chung. Các gốc tự do luôn tồn tại trong cơ thể, sự sản sinh các gốc tự do xảy ra liên tục trong tất cả tế bào như là một phần của chức năng tế bào bình thường. Ở nồng độ cao chúng là nguyên nhân thúc đẩy oxy hóa, phân hủy đại phân tử sinh học (Pacher và cộng sự, 2007; Udenigwe và

cộng sự, 2009). Mặc dù trong cơ thể luôn có cơ chế tự bảo vệ khỏi các quá trình oxy hóa nhưng không đủ để chống chọi trong một số trường hợp nghiêm trọng (Fasakin và cộng sự, 2011).

Hiện nay, một số chất chống oxy hóa tổng hợp như butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) đã được thêm vào thực phẩm. Tuy nhiên, những hạn chế về việc sử dụng các hợp chất này đang được chú ý. Nghiên cứu của Agudo và cộng sự (2007), đã chỉ ra rằng một

số hợp chất trong thực vật có hoạt tính chống oxy hóa như vitamin C, carotenoids, lycopene, ... Chế độ ăn uống giàu thức ăn nguồn gốc thực vật nói chung giúp làm giảm nguy cơ của một số bệnh thoái hóa. Vì vậy, chất chống oxy hóa tự nhiên có nguồn gốc từ thực vật với hoạt tính chống oxy hóa cao càng được quan tâm.

Cây lá đắng (*Vernonia amygdalina*) có nguồn gốc từ Châu Phi trồng ở Củ Chi được sử dụng như một loại rau, một loại gia vị súp đắng hoặc một loại thuốc. Theo một số báo cáo, cây lá đắng là một phương thuốc dân gian giảm đau, chống khuẩn, chống giun và chống viêm (Atangwho và cộng sự, 2009). Năm 1994, Igile và cộng sự (1994), báo cáo về sự hiện diện của flavonoid bao gồm luteolin, luteolin 7-O- β -glucuronoside, và luteolin 7-O- β -glucoside trong cây này. Có thể thấy, cây lá đắng giàu chất chống oxy hóa tự nhiên và là một nguyên liệu tiềm năng để khai thác và nghiên cứu.

Tuy nhiên, ở nước ta hiện nay đang sử dụng cây lá đắng điều trị bệnh như một bài thuốc dân gian mà chưa có một nghiên cứu nào về nguyên liệu này. Ở nước ngoài, các nghiên cứu về cây lá đắng vẫn còn hạn chế và chỉ dừng lại ở mức so sánh với các loại cây khác như: *Azadirachta indica*, *Gongronema latifolium* (Atangwho và cộng sự, 2009), *Ocimum gratissimum* (Oriakhi và cộng sự, 2014), ... Mặt khác, các nghiên cứu có rất ít thông tin về điều kiện trích ly các chất chống oxy hóa từ lá cây lá đắng bằng dung môi nước. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đưa ra các thông số của quá trình trích ly để đạt hiệu suất thu hồi các hợp chất polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao ứng dụng trong lĩnh vực nước giải khát nói riêng, ngành công nghệ thực phẩm nói chung.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Lá đắng được thu hái tại xã Trung Lập Hạ, huyện Củ Chi, TP. Hồ Chí Minh từ tháng 3 đến tháng 4 năm 2017, lá được chọn là lá già, màu xanh và đảm bảo còn tươi, không bị sâu hại, dập nát. Lá đắng chuyển về phòng thí nghiệm và được rửa sạch, để ráo, sấy ở nhiệt độ 60°C trong 4 giờ, đạt độ ẩm $6,5 \pm 1\%$. Sau đó được

xay nhỏ đến kích thước $0,3 \div 0,5$ mm và bảo quản trong túi PA ghép mí chân không, ở nhiệt độ $<4^{\circ}\text{C}$ và tránh ánh sáng trực tiếp.

Thuốc thử Folin-Ciocalteu được mua từ Merck KgaA (Đức).

Quercetin, acid gallic, thuốc thử DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) mua từ Sigma Aldrich (USA).

Na_2CO_3 , NaNO_2 , AlCl_3 , NaOH , methanol, vitamin C đạt chuẩn dùng trong phân tích phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu : dung môi đến quá trình trích ly

Cân chính xác 1 gram lá đắng vào bình tam giác đã được bao kín, tránh ánh sáng, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi lần lượt được khảo sát (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50), thời gian trích ly 30 phút. Các bình trích ly được đặt trong bể ổn nhiệt với nhiệt độ được điều chỉnh ở 60°C (thông số nhiệt độ và thời gian trích ly được cố định là 60°C/ 30 phút).

Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng polyphenol tổng (TPC), hàm lượng flavonoid tổng (TFC) và hoạt tính kháng oxy hóa (DPPH).

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình trích ly

Trong thí nghiệm này, thời gian trích ly được thay đổi từ 10 phút đến 70 phút với $\Delta t = 10$ (phút). Thông số tỷ lệ nguyên liệu: dung môi được xác định ở Thí nghiệm 2.2.1. Nhiệt độ trích ly được cố định ở 60°C.

Chỉ tiêu theo dõi: TPC, TFC và DPPH.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly

Ở thí nghiệm này, nhiệt độ sẽ được thay đổi từ 50°C đến 90°C với $\Delta T = 10$ (°C). Thông số tỷ lệ nguyên liệu: dung môi được xác định ở Thí nghiệm 2.2.1. Thông số thời gian trích ly được xác định ở Thí nghiệm 2.2.2.

Chỉ tiêu theo dõi: TPC, TFC và DPPH.

2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

2.3.1. Phương pháp phân tích

Phương pháp định lượng Polyphenol tổng (TPC): hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết được xác định theo TCVN 9475-1-2013 bằng phương pháp quang phổ so màu với thuốc thử Folin - ciocalteu và chất chuẩn acid gallic, đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 765nm. Hàm lượng polyphenol tổng được thể hiện qua số mg acid gallic tương đương (GAE)/100g chất khô.

Phương pháp định lượng Flavonoid tổng (TFC): hàm lượng các hợp chất flavonoid được phân tích dựa trên phương pháp quang phổ so màu (Sulaiman và Balach, 2012) theo nguyên tắc: Flavonoid trong lá đắng tạo phức màu vàng với dung dịch $AlCl_3$. Cường độ màu tỉ lệ thuận với hàm lượng flavonoid được xác định ở bước sóng 510nm. Tổng lượng flavonoid được thể hiện qua số mg quercetin tương đương (QE)/100g chất khô.

Phương pháp kiểm tra hoạt tính kháng oxy hóa (Azrina và cộng sự, 2010): Hoạt tính kháng

oxy hóa được xác định bằng thuốc thử DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), đo mật độ quang tại bước sóng 517nm. Hoạt tính kháng oxy hóa được thể hiện qua nồng độ vitamin C tương đương (ppm VitC).

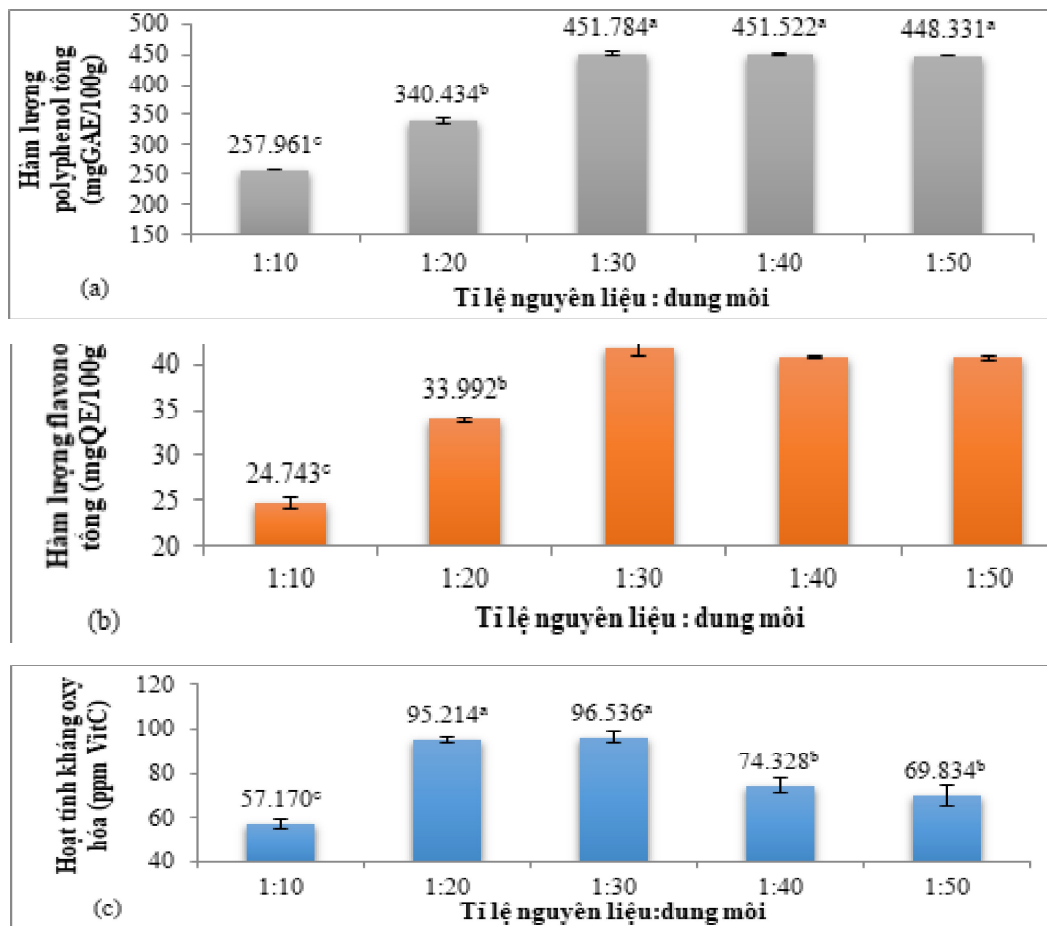
2.3.2. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm tiến hành lặp lại ba lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm giá trị sai số. Đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp thống kê ANOVA 1 chiều ($\alpha = 5\%$) trên phần mềm JMP X7.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến quá trình trích ly

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến hàm lượng TPC, TFC và DPPH trong dịch trích ly được trình bày ở Hình 1:



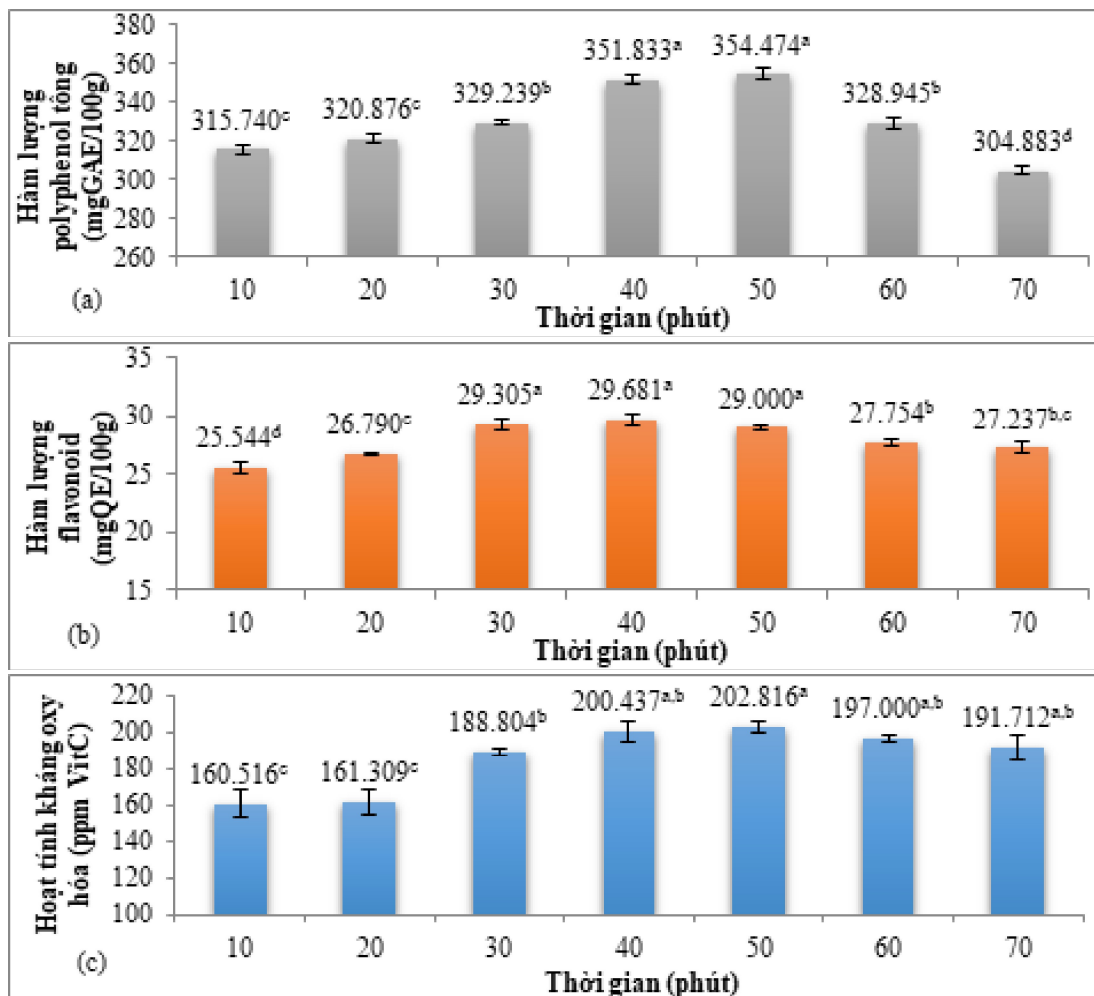
Hình 1: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng (a), hàm lượng flavonoid tổng (b), hoạt tính kháng oxy hóa (c) của dịch trích ly cây lá đắng

Theo Al-Farsi và Chang (2007), tỷ lệ nguyên liệu : dung môi càng cao có thể thúc đẩy gradient nồng độ càng tăng cao, dẫn đến tăng tốc độ khuếch tán cho phép quá trình trích ly được tốt hơn (Al-Farsi và Lee, 2008). Ngoài ra, theo Zhang và cộng sự (2007), cơ hội của các thành phần hoạt tính sinh học tiếp xúc với dung môi trích ly được mở rộng với sự gia tăng lượng dung môi, dẫn đến tăng hiệu suất trích ly (Zhang, Bi, và Liu, 2007). Kết quả thể hiện trong Hình 1 cho kết quả phù hợp, hàm lượng TPC, TFC và DPPH tăng từ tỷ lệ nguyên liệu : dung môi 1:10 đến 1:30. Tuy nhiên, hàm lượng các thành phần sẽ không tiếp tục tăng khi đã đạt được sự cân bằng (Wong, Tan và Ho, 2013). Cả ba biểu đồ đều thể

hiện các chỉ tiêu tăng dần đến tỷ lệ nguyên liệu : dung môi 1:30 thì dừng lại, dù tăng tỷ lệ nguyên liệu : dung môi vẫn không tăng hiệu quả trích ly mà chỉ làm pha loãng dịch trích ly. Tỷ lệ nguyên liệu : dung môi tối ưu ở thí nghiệm này là 1:30 ($451,784 \pm 1,995$ mg GAE/100g, $41,735 \pm 0,791$ mg QE/100g, $96,536 \pm 2.920$ ppm VitC).

3.2. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình trích ly

Thời gian trích ly cũng là một yếu tố quan trọng. Thời gian trích ly ảnh hưởng có ý nghĩa ($p < 0,05$) đến cả ba chỉ tiêu: TPC, TFC và DPPH được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2: Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng (a), hàm lượng flavonoid tổng (b), hoạt tính kháng oxy hóa (c) của dịch trích ly cây lá đắng

Do lúc đầu hàm lượng polyphenol trong lá đắng lớn nên sự chênh lệch nồng độ giữa bên trong và bên ngoài tế bào cao, vì vậy mà TPC và

DPPH trong dịch trích ly tăng mạnh (từ 10 đến 40 phút). Tuy nhiên, theo thời gian hàm lượng polyphenol bên trong và bên ngoài tế bào gần

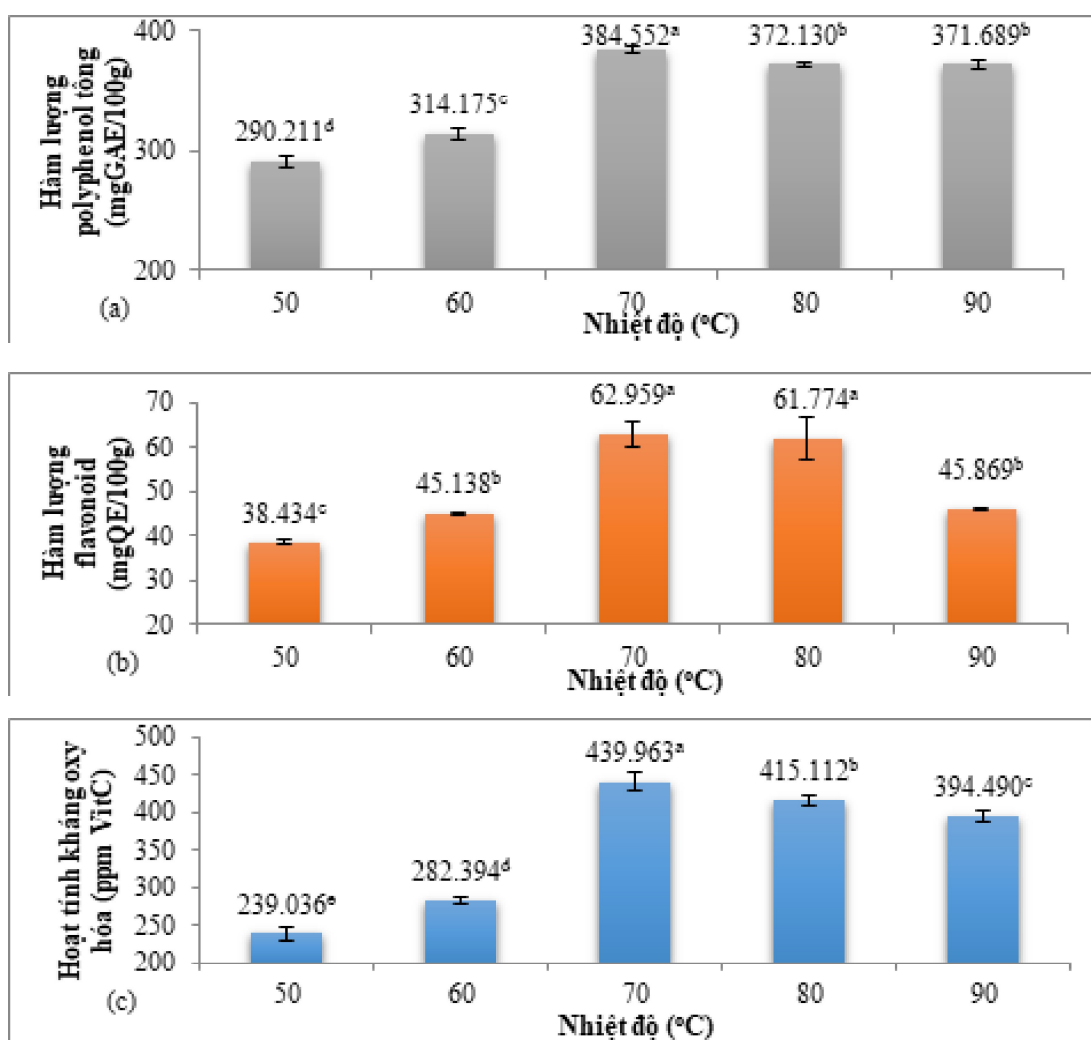
đạt đến trạng thái cân bằng nên làm cho lượng polyphenol thu được tăng chậm dần (từ 40 đến 50 phút) theo định luật Fick (Pinelo, Sineiro và Núñez, 2006), và sau đó giảm (từ 50 đến 70 phút) do thời gian trích ly lâu trong nhiệt độ cao làm một số polyphenol không bền nhiệt và giảm chất lượng theo thời gian. Hàm lượng flavonoid tổng cũng tăng dần đến mốc thời gian giới hạn (50 phút) và giảm sau khoảng thời gian đó.

Qua Hình 2 cho thấy, hàm lượng TPC, TFC, DPPH ở mức thời gian 40 phút ($351,833 \pm 2,745$ mg GAE/100g; $29,681 \pm 0,568$ mg QE/100g; $200,437 \pm 5,392$ ppm VitC) và 50 phút ($354,474 \pm 2,905$ mg GAE/100g; $29,000 \pm 0,12$ mg

QE/100g; $202,816 \pm 3,060$ ppm VitC), tuy có khác nhau nhưng sự khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Từ kết quả như trên, để không tốn thời gian và năng lượng, 40 phút là thời gian trích ly được lựa chọn.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình trích ly

Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và hoạt tính kháng oxy hóa trong dịch trích ly được khảo sát ở nhiệt độ từ $50 \div 90^\circ\text{C}$, kết quả được thể hiện qua Hình 3:



Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng (a), hàm lượng flavonoid tổng (b), hoạt tính kháng oxy hóa (c) của dịch trích ly cây lá đắng

Hình 3 cho thấy, hàm lượng TPC, TFC và DPPH đạt giá trị cao nhất ở nhiệt độ 70°C , lần lượt đạt các giá trị sau: $384,552 \pm 2,832$

mg GAE/100g; $62,959 \pm 2,972$ mg QE/100g; $493,963 \pm 12,395$ ppm VitC. Kết quả này gần với kết quả thí nghiệm của Mohamed và Chang

(2007), về nhiệt độ trích ly đối với trái chà là (*Phoenix dactylifera* L.) ở 65°C (Al-Farsi và Lee, 2008).

Hàm lượng TPC, TFC và DPPH tăng từ mức nhiệt độ 50°C đến 70°C. Kết quả này có thể giải thích như sau, khi nhiệt độ tăng cao sẽ tăng cường sự phân hủy các thành phần của tế bào thực vật, làm tăng khả năng thẩm thấu qua màng tế bào, từ đó giúp giải phóng polyphenol trong mẫu (Wang và cộng sự, 1998). Ngoài ra, khi nhiệt độ tăng cao, làm tăng độ hòa tan, tốc độ truyền khối cũng như giảm độ nhớt và sức căng bề mặt của các dung môi góp phần làm cho tỉ lệ khai thác các hợp chất polyphenol cao hơn (Brglez và cộng sự, 2012).

Tuy nhiên, nhiệt độ cao không phải lúc nào cũng thích hợp để chiết xuất các hợp chất polyphenol, vì nó sẽ làm biến tính các hợp chất nhạy cảm với nhiệt (Jing, Dong và Tong, 2015). Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến TPC, TFC và DPPH giảm khi nhiệt độ bắt đầu tăng từ 70°C lên 90°C. Do đó, nhiệt độ 70°C được chọn là nhiệt độ trích ly cho các thí nghiệm.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã đưa ra được các thông số nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ nguyên liệu : dung môi ảnh hưởng cụ thể đến hiệu quả trích ly các hợp chất chống oxy hóa từ cây lá đắng *Vernonia amygdalina* với dung môi là nước. Để đạt được điều kiện trích ly tốt nhất về 3 hàm mục tiêu TPC, TFC, DPPH với dung môi nước ở 70°C trong 40 phút với tỷ lệ nguyên liệu : dung môi 1:30 sẽ đạt được kết quả là 451,784 ± 1,995 mg GAE/100g; 41,735 ± 0,791 mg QE/100g; 96,536 ± 2,920 ppm VitC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agudo, A., Cabrera L., Amiano P., Ardanaz, E., Barriarte, A., Berenguer, T., et al. (2007). Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr*, 85, pp. 1634-1642.

Al-Farsi, M. A. and Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from

date seeds. *Food Chemistry*, 108, pp. 977-985.

Atangwho, I., Ebong, P., Eyong, E., Williams, I., Eteng, M., and Egbung, G. (2009). Comparative chemical composition of leaves of some antidiabetic medicinal plants: *Azadirachta indica*, *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. *African Journal of Biotechnology*, 8, pp. 4685.

Azrina, A., Nadiah, M. N., and Amin, I. (2010). Antioxidant properties of methanolic extract of *Canarium odontophyllum* fruit. *International Food Research Journal*, 17, pp. 319-326.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž. and Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21, p. 901.

Fasakin, C. F., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. (2011). Antioxidant properties of chlorophyll-enriched and chlorophyll-depleted polyphenolic fractions from leaves of *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. *Food Research International*, 44 (2011), pp. 2435-2441.

Lại Thị Ngọc Hà và Vũ Thị Thu (2009). Stress oxy hóa và các chất chống oxy hóa tự nhiên. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7 (5), tr. 667-677.

Igile, G. O., Oleszek, W., Jurzysta, M., Burda, S., Fafunso, M. and Fasanmade, A. A. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, pp. 2445-2448.

Jing, C. L., Dong, X. F. and Tong, J. M. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from Alfalfa using response surface method. *Molecules*, 20, pp. 15550-15571.

Oriakhi, K., Oikeh, E. I., Ezeugwu, N., Anoliefo, O., Aguebor, O. and Omeregbe, E. S. (2014). Comparative antioxidant activities of extracts of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* leaves. *Journal of Agricultural Science*, 6, p. 13.

Pinelo, M., Sineiro, J. and Núñez, M. A. J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77, pp. 57-63.

Sulaiman, C. and Balach, I. (2012). Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74, p. 258.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2013). TCVN 9745-1:2013, *Chè - Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen - Phần 1: Hàm lượng Polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo*

- màu dùng thuốc thử Folin - Ciocalteu [Tham khảo tại: <http://trungtamnghienquuthucpham.vn/tcvn-9745-1-2013-che-xac-dinh-cac-chat-dac-trung-cua-che-xanh-va-che-den-phan-1/>].
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J. and Huang, T. C. and Ho, C. T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 4869-4873.
- Wong, B., Tan, C. P., and Ho, C. (2013). Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak” (*Phyllanthus niruri*). *International Food Research Journal*, 20, pp. 325-330.
- Zhang, S. Q., Bi, H. M. and Liu, C. J. (2007). Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultra high hydrostatic pressure. *Separation and Purification Technology*, 57, pp. 277-282.