

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT ĐẾN HOẠT TÍNH CHỐNG OXI HÓA CỦA CÂY XẠ ĐEN (*CELASTRUS HINDSU BENTH*) TRỒNG TẠI KHÁNH HÒA

● VŨ LỆ QUYÊN - NGUYỄN HỒNG NGÂN - ĐỖ TRỌNG SƠN

TÓM TẮT:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hoạt tính chống oxi hóa của cây xạ đen (*Celastrus hindsu benth*) trồng tại Khánh Hòa. Hoạt tính chống oxi hóa được xác định dựa vào khả năng khử gốc tự do DPPH và tổng năng lực khử của dịch chiết từ xạ đen. Kết quả chỉ ra rằng, lá của cây xạ đen có hoạt tính chống oxi hóa cao nhất trên cả 2 phép thử (khả năng khử gốc tự do và tổng năng lực khử), điều kiện chiết thích hợp là dung môi nước, thời gian 10 phút, nhiệt độ 95°C, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu 30/1(ml/g).

Từ khóa: Xạ đen, hoạt tính chống oxi hóa, Khánh Hòa.

I. Đặt vấn đề

Ngày nay, những hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học được tách chiết từ thực vật và được ứng dụng rất nhiều trong ngành công nghiệp, nông nghiệp và chăm sóc sức khỏe con người. Chúng được dùng làm thực phẩm chức năng, làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm. Trong đó, xạ đen là loại cây được nhiều người quan tâm đến. Dân gian thường dùng cây xạ đen như một bài thuốc nam để trị và phòng ngừa các bệnh u biểu, mụn nhọt, ung thũng, huyết áp cao [8]... Gần đây, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu và công bố các hợp chất được tìm thấy trong xạ đen có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxi hóa, và hạn chế sự phát triển của một số tế bào ung thư như flavonoid, saponin triterpenoid, alkaloid, diphenylpropane [1,2,3,4,5]... Tuy nhiên, điều kiện tách chiết và tinh chế ảnh hưởng rất nhiều đến hoạt tính sinh học của những chất cần chiết.

Ngoài ra, các nhà khoa học đã tìm thấy trong xạ đen có chứa triterpene và các hợp chất phenol[8,9]. Đây là những thành phần quan trọng, có tính dược lý cao, có khả năng hỗ trợ hệ tiêu hóa, tăng cường chức năng tiêu hóa trong cơ thể, đồng thời chống các thể bệnh liên quan đến viêm dạ dày, ung thư dạ dày, ung thư đại trực tràng [3,9]. Sở dĩ triterpene có dược lý trên là do nó có khả năng khử gốc tự do. Ngoài ra, nó còn tham gia vào quá trình truyền xung thần kinh lên não nên nó đóng vai trò quan trọng đối với hệ thần kinh, có tác dụng duy trì sự ổn định, từ đó kiểm soát mọi chức năng của cơ thể sống.

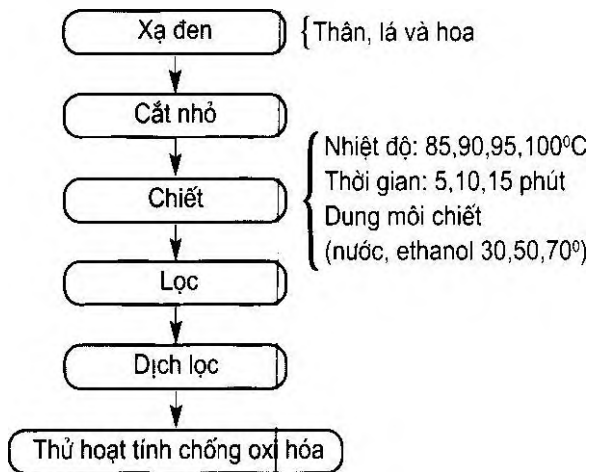
Hu XQ và cộng sự (2014) cũng xác định được hợp chất diphenylpropane có trong xạ đen được tách chiết, tinh chế và nghiên cứu tại phòng thí nghiệm để ức chế sự phát triển của 4 loại tế bào ung thư khác nhau là ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư phổi và ung thư gan.

II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Đối tượng nghiên cứu

Xạ đen (*Celastrus hindsu*) sử dụng trong nghiên cứu được thu hái tại Khánh Hòa. Cây có tuổi đời từ 10-12 năm. Hoa, lá và thân xạ đen được thu hái ở dạng tươi vào đầu các buổi sáng, có hàm ẩm là 75 - 77%, được đưa về phòng thí nghiệm để tiến hành thí nghiệm. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được thể hiện trên Hình 1.

Hình 1: Sơ đồ BTTN nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ xạ đen (*Celastrus hindsu benth*)



Cách tiến hành: Lá, hoa hoặc thân xạ đen được thu hoạch đưa về phòng thí nghiệm, tiến hành cắt nhỏ đến kích thước 0,5 - 1cm, chiết bằng một số dung môi khác nhau như nước và ethanol (30, 50, 70 độ), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20, 30, 40, 50/1 (ml/g) ở thời gian (5,10,15 phút) và nhiệt độ khác nhau (85, 90, 95, 100oC). Sau đó, tiến hành lọc bằng giấy lọc whatman để thu dịch lọc và tiến hành xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá xạ đen.

2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định khả năng khử gốc tự do DPPH theo phương pháp của Fu (2002) [6] có hiệu chỉnh cụ thể như sau: Dùng 0,2 - 0,5ml dịch cần đo (đã được pha loãng đến nồng độ thích hợp), sau đó thêm nước cất vào để đạt tổng thể tích là 3ml. Sau đó, thêm 1 ml dung dịch DPPH 0,1mM, lắc đều hỗn hợp, để ở nhiệt độ phòng, trong bóng tối 30 phút. Sau đó đưa mẫu đi đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 517nm.

Xác định tổng năng lực khử theo phương pháp của Oyaizu (1986) [7] với một vài hiệu chỉnh nhỏ.

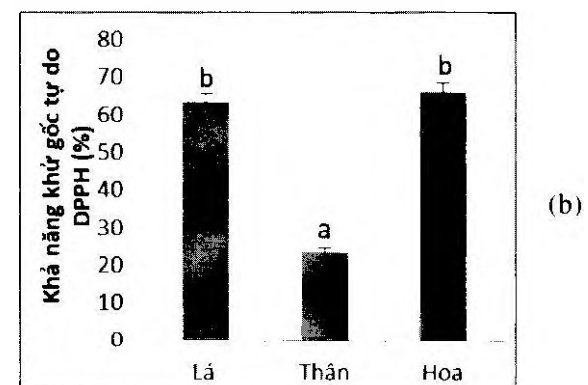
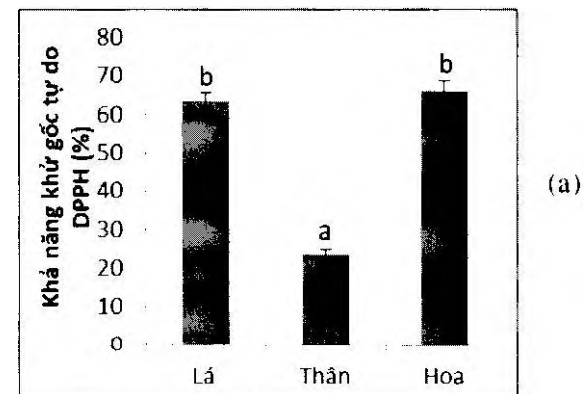
Cụ thể như sau: Các thể tích khác nhau của dịch chiết (0,2-0,5) ml được trộn với đệm phosphate pH = 6,6 để đạt thể tích cuối cùng 1ml trước khi thêm 0,5ml $K_3(Fe[CN]_6)$ 1%. Hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó thêm 0,5ml TCA 10% và 2ml nước cất, cuối cùng 0,4ml $FeCl_3$ 0,1% được thêm vào. Độ hấp thụ quang học được xác định tại bước sóng 700nm. Độ hấp thụ 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 thụ quang học lên 0,50. IC_{50} càng thấp thì tổng năng lực khử càng cao.

III. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

1. Khả năng chống oxy hóa của các bộ phận khác nhau của xạ đen

Các bộ phận khác nhau của cây chứa thành phần hóa học không giống nhau. Do đó, tác giả tiến hành thu dịch chiết từ thân, lá và hoa của cây xạ đen và xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thu được. Kết quả thể hiện trên Hình 2.

Hình 2: Khả năng chống oxy hóa của dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của xạ đen được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b)



Kết quả Hình 2a cho thấy khả năng khử gốc tự do DPPH của lá và hoa tương đương nhau, trong khi giá trị IC_{50} của hoa cao hơn của lá. Điều này có thể là do các phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa khác nhau sẽ có độ nhạy khác nhau đối với các hợp chất chống oxy hóa có trong dịch chiết.

Kết quả Hình 2 cũng cho thấy phần lá có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn phần thân. Kết quả này trái ngược với công bố của Lê Thế Trung, 2012. Tác giả này cho rằng phần thân cây cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với phần lá. Sự khác biệt này có thể giải thích là do đối tượng nghiên cứu không giống nhau về độ tuổi của cây và nơi thu hoạch xạ đen. Điều này ảnh hưởng rất lớn đến kết quả nghiên cứu. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng cây xạ đen trồng ở vùng núi, đá, ít nước thì có hoạt tính cao hơn so với những cây được trồng ở vùng thổ nhưỡng, dinh dưỡng đất tốt. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng lá cây được thu hoạch trong các mùa khác nhau thì có hoạt tính khác nhau. Mùa khô, lượng mưa và nước tưới ít sẽ cho lá có hoạt tính cao hơn các mùa còn lại. Do trong điều kiện sống khó khăn, cây cần tích tụ và sản sinh ra những chất có hoạt tính sinh học để giúp cây chống lại với điều kiện sống khắc nghiệt. Tuy nhiên, những cây sống trong điều kiện thổ nhưỡng khắc nghiệt thường cho sản lượng lá thấp hơn so với những cây có điều kiện sống tốt hơn.

Kết quả này giúp chúng ta lựa chọn nguyên liệu thích hợp để chiết suất dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa là lá xạ đen và đây cũng là nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa

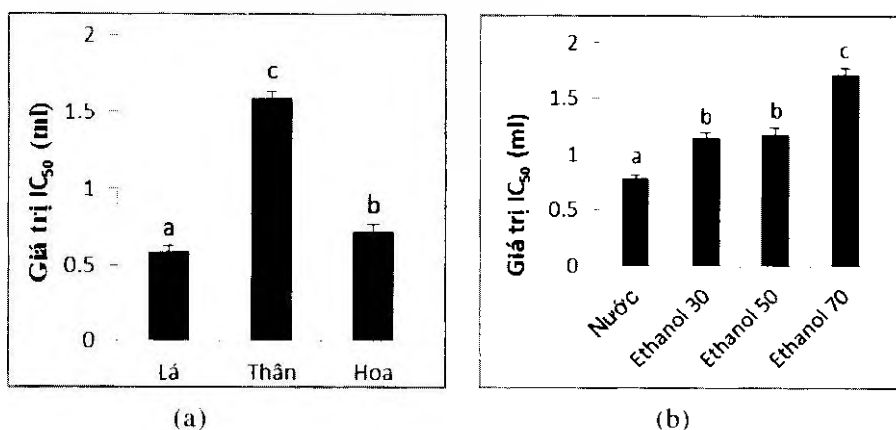
Dung môi chiết là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá xạ đen. Từ các nghiên cứu trước đây về thành phần các chất có hoạt tính sinh học trong xạ đen [2,3,8,9]. Tác giả tiến hành chiết bằng dung môi nước và ethanol 30, 50, 70 độ. Kết quả thể hiện trên Hình 3.

Kết quả trên Hình 3 cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết khi chiết bằng nước cao hơn ethanol ở các nồng độ khác nhau. Khi khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết bằng nước là 59,9%, thì khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết bằng ethanol giảm dần theo chiều tăng của nồng độ ethanol. Một xu hướng tương tự cũng được ghi nhận đối với phương pháp tổng năng lực khử. Theo đó, dung môi chiết là nước cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn khi giá trị IC_{50} của nước là thấp nhất ($P < 0,05$).

Kết quả này có thể giải thích như sau: Độ phân cực của dung môi và hợp chất tự nhiên là rất quan trọng trong chiết xuất. Dung môi phân cực sẽ hòa tan tốt các hợp chất phân cực. Flavonoid, quinone, saponin triterpenoid trong lá xạ đen đều là hợp chất có độ phân cực, do đó hiệu quả chiết của dung môi tăng khi độ phân cực tăng. Điều này càng được chứng minh khi nước có độ phân cực lớn hơn ethanol, độ phân cực của nước là 16đP và độ phân cực của ethanol chỉ là 8,8đP. Nên khả năng hòa tan các chất có hoạt tính sinh học trong lá xạ đen vào nước dễ dàng hơn so với ethanol. Các chất có hoạt tính chiết được càng nhiều thì hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết càng cao.

Từ những kết quả đạt được chúng tôi chọn dung môi chiết là nước cho những thí nghiệm tiếp theo. Đây cũng là dung môi có nhiều ưu điểm như dễ kiếm, rẻ tiền, không độc và quan trọng hơn là khi dùng nước để chiết thì quá trình ứng dụng dịch chiết này trong thực phẩm và thực phẩm chức năng sẽ không phải thực hiện một công đoạn phức tạp như cô quay chân không để đuổi các dung môi hữu cơ.

Hình 3: Ảnh hưởng của dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của lá xạ đen được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b)



3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi chiết/nguyên liệu đến hoạt tính chống oxy hóa

Để lựa chọn được tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp. Tác giả tiến hành thí nghiệm theo các tỉ lệ sau: 20/1, 30/1, 40/1, 50/1.

Hình 4 cho thấy tỷ lệ nước/nguyên liệu là 30/1 sẽ thích hợp nhất cho quá trình chiết để thu được dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa cao. Tỷ lệ này cho khả năng khử gốc tự do DPPH là (63,33%), giá trị IC₅₀ là 0,85ml thấp hơn so các tỷ lệ chiết khác. Kết quả này có thể giải thích như sau: Ở tỉ lệ chiết thấp, lượng dung môi chưa đủ ngập hết nguyên liệu làm cho quá trình khuếch tán và hòa tan các chất cần chiết (Flavonoid, quinone, saponin triterpenoid,

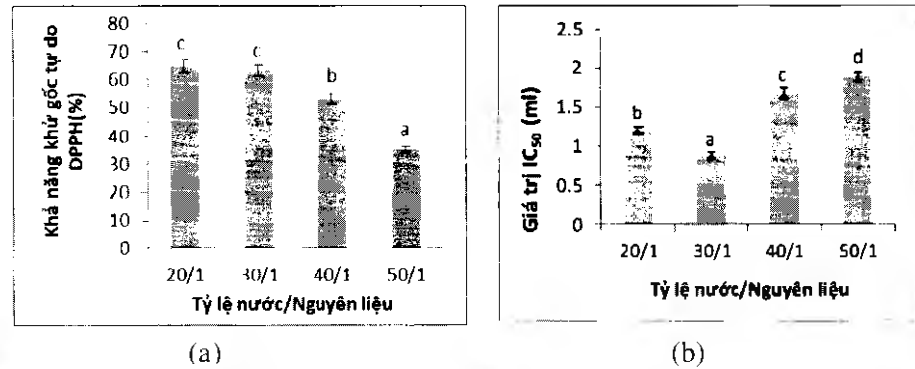
diphenylpropane,...) xảy ra không triệt để. Do đó, hàm lượng các chất chống oxy hóa trong dịch chiết thường không cao nên hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thấp. Khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng lên 40/1, 50/1 hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết giảm. Do đó, chúng tôi chọn tỷ lệ dung môi chiết/nguyên liệu thích hợp là 30/1.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt tính chống oxy hóa

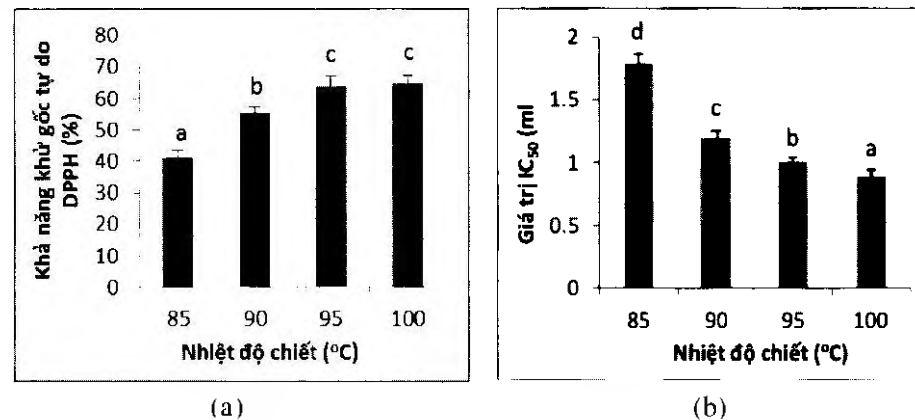
Nhiệt độ chiết là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thu được. Hình 5a chỉ ra rằng: Khi nhiệt độ chiết tăng thì khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết cũng tăng lên và giá trị IC₅₀ giảm mạnh có nghĩa là hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết cũng tăng theo nhiệt độ chiết. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ từ 95°C đến 100°C thì hoạt tính chống oxy hóa tăng không đáng kể.

Nhiệt độ tăng thuận lợi cho việc phá hủy màng tế

Hình 4: Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL đến hoạt tính chống oxy hóa của lá xạ đen được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b)



Hình 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính chống oxy hóa của lá xạ đen được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b)



bào thực vật và tăng tốc độ khuếch tán của các hợp chất chống oxy hóa ra khỏi lá xạ đen vào dung môi chiết do độ nhớt của dịch sẽ giảm, đồng thời sự thẩm thấu của dung môi vào tế bào nguyên liệu cũng tăng. Do đó, hàm lượng các chất có hoạt tính chống oxy hóa thu được nhiều hơn, dẫn đến hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng cao có thể xảy ra các phản ứng không mong muốn, gây khó khăn cho quá trình tinh chế dịch chiết sau này. Ngoài ra, nhiệt độ cao còn làm các chất có hoạt tính chống oxy hóa như flavonoid, saponin triterbenoid, quinon, alkaloid, diphenylpropane dễ bị phá hủy một phần, làm giảm hàm lượng và hoạt tính của chúng.

Ở nhiệt độ 100°C hoạt tính của dịch chiết tăng, tuy nhiên, giá trị này không có sự khác biệt về mặt thống kê so với điều kiện chiết là 95°C. Do đó, để giảm kinh phí nhiệt năng chúng chọn nhiệt độ chiết thích hợp là 95°C cho những thí nghiệm tiếp theo.

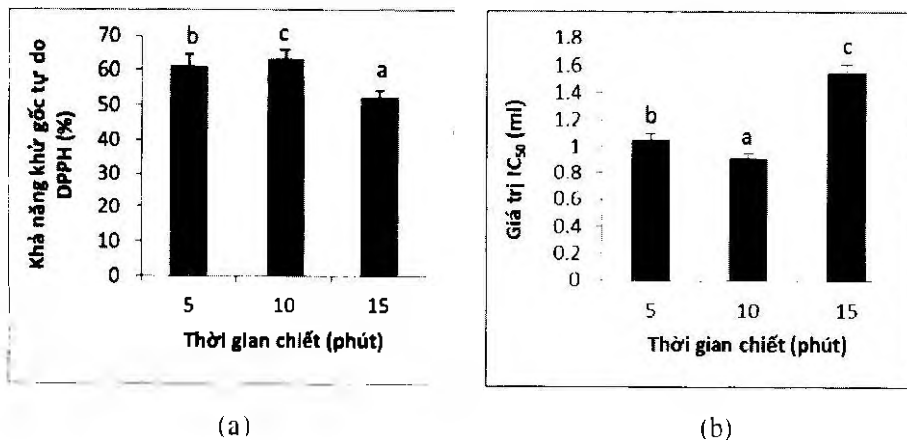
3.5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa

Hình 6 cho thấy ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá xạ đen. Thời gian chiết ở 10 phút cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn đáng kể so với chế độ chiết có thời gian ngắn hơn hoặc dài hơn.

Hình 6 cho thấy, ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá xạ đen. Thời gian chiết ở 10 phút cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn đáng kể so với chế độ chiết có thời gian ngắn hơn hoặc dài hơn.

Nếu thời gian chiết quá ngắn sẽ không đủ để trích ly triệt để các hợp chất có hoạt tính ra khỏi tế bào, nếu thời gian chiết kéo dài trong điều kiện nhiệt độ cao (95°C) sẽ giúp dung môi thẩm thấu vào trong từng tế bào lá xạ đen qua các mao quản, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình khuếch tán chất chống oxy hóa vào dung môi chiết. Khi bắt đầu chiết các chất có phân tử lượng nhỏ (thường là hoạt chất) sẽ được hòa tan và khuếch tán vào dung

Hình 6: Ảnh hưởng của thời gian đến hoạt tính chống oxy hóa của lá xạ đen được xác định bằng phương pháp khử gốc tự do DPPH (a) và tổng năng lực khử (b)



môi trước, sau đó mới đến các chất có phân tử lượng lớn (thường là tạp như nhựa, keo,...). Điều này có thể giải thích cho kết quả Hình 6a: Khi tăng thời gian chiết từ 5 đến 10 phút thì khả năng khử gốc DPPH thay đổi không đáng kể, nếu tiếp tục kéo dài thời gian chiết lên 15 phút thì khả năng khử gốc DPPH lại giảm đáng kể. Vì dung dịch chiết duy trì ở nhiệt độ cao (95°C) trong thời gian dài sẽ làm ảnh hưởng đến hoạt tính của các chất có trong dung dịch.

Từ những kết quả đạt được, chúng tôi chọn thời gian chiết thích hợp là 20 phút ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Hu XQ, Han W, Liu QX, XU XK, Fu P, Li HL. (2014). Three new diphenylpropanes from *Celastrus hindsii*. *Pharmacol Research*, 1411-1415.
2. Huang, H.C., C.C. Shen, C.F. Chen, Y.C. Wu, and Y.H. Kuo. (2000). A novel agarofuran sesquiterpene, celahin D from *Celastrus hindsii* Benth. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48, 1079-1080.
3. Kuo, Y.H., and L.M. Yang-Kuo. (1997). Antitumour and anti-AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44, 1275-1281.
4. Kuo, Y.H., C.J. Chou, L.M. Yang-Kuo, Y.Y. Hu, Y.C. Chen, C.F. Chen, and K.H. Lee. (1996). A sesquiterpene ester from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 41, 549-551.
5. Kuo, Y.H., C.F. Chen, L.M. Yang-Kuo, and A. Celahinine. (1995). A new sesquiterpene pyridine alkaloid from *Celastrus hindsii*. *Journal of Natural Products*, 58, 1735-1738.
6. Fu, H.; Shieh, D.; Ho, C. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *J. Food Lipids*, 9, 35-46.
7. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan. J. Nutri.*, 44, 307-315.

8. Tram.N.L, M. Shimoyamada, and R. Yamauchi. (2006). Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3786-3793.

9. Trinh, T.T., Nguyen, H.C., Pham,T.N., và Tran, V.S. (2008). Isolation and structural characterization of triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth. *Tạp chí Hóa học* 46: 456-461.

Ngày nhận bài: 3/6/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 13/6/2020

Ngày chấp nhận đăng bài: 23/6/2020

Thông tin tác giả:

1. ThS. VŨ LÊ QUYÊN

2. ThS. NGUYỄN HỒNG NGÂN

Trường Đại học Nha Trang

3. ĐỖ TRỌNG SƠN

Trường Đại học Nha Trang

**IMPACTS OF EXTRACTION CONDITIONS
ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF XA DEN
(*CELASTRUS HINDSU BENTH*)
GROWN IN KHANH HOA PROVINCE**

● Master. **VU LE QUYEN**

Nha Trang University

● Master. **NGUYEN HONG NGAN**

Nha Trang University

● **DO TRONG SON**

Nha Trang University

ABSTRACT:

This study is to evaluate the extraction conditions affecting the antioxidant activity of Xa den (*Celastrus hindsii* benth) which is grown in Khanh Hoa Province during the extraction process. The antioxidant activity is determined by the DPPH free radical scavenging activity and the total antioxidant capacity of the extract from *Celastrus hindsii* benth. This study's findings show that the leaves of *Celastrus hindsii* benth have the highest antioxidant activity with the water solvent, extraction time of 10 minutes, extraction temperature at 95°C and the ratio of extraction solvent/material of 30/1 (ml/g).

Keywords: *Celastrus hindsii* benth, antioxidant activity, Khanh Hoa Province.