

ẢNH HƯỞNG CỦA VI SÓNG ĐẾN TRÍCH LY FLAVONOID TỪ LÁ TRỨNG CÁ *MUNTINGIA CALABURA L.*

● NGUYỄN THỊ DIỄM TRINH
- NGUYỄN THỊ THU HUYỀN - HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

TÓM TẮT:

Nghiên cứu này nhằm xác định điều kiện của quá trình trích ly flavonoid tổng từ lá trứng cá với sự hỗ trợ của vi sóng và đánh giá khả năng chống oxy hóa của dịch trích flavonoid thu được. Khảo sát điều kiện trích ly bao gồm: loại dung môi trích ly, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (DM/NL), công suất (W) và thời gian xử lý vi sóng (giây), các yếu tố khác được cố định dựa trên kết quả của các khảo sát trước đó. Hàm mục tiêu là hàm lượng flavonoid tổng (TFC, mg QE/g chất khô) xác định theo phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ trong môi trường kiềm-trắc quang và khả năng bắt gốc tự do của mẫu dịch chiết theo DPPH. Theo đó, TFC thu được là 127.30 mg QE/g chất khô tại công suất 450 W, thời gian 40 giây. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của mẫu dịch chiết ở điều kiện tích hợp (IC_{50}) bằng 54.29 μ g/ml.

Từ khóa: DPPH, flavonoid, *Muntingia calabura*, tối ưu, vi sóng.

1. Đặt vấn đề

Các nghiên cứu về khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của cao chiết lá và quả của cây trứng cá với methanol đã được tiến hành trên hai loài *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* [1]. Lá trứng cá cho thấy khả năng kháng oxy hóa và ức chế vi khuẩn gây bội nhiễm mụn trứng cá, theo đó giá trị IC_{50} là 34.26 μ g/ml [2]. Cây trứng cá có nhiều các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng như: polyphenol, flavonoid, tanin, alkaloids, glycosids, saponins, stigmasterol [3]. Flavonoid là hợp chất chống oxy hóa mạnh giúp cho cơ thể có thể chống lại các tổn thương do sự oxy hóa và các gốc tự do, được tìm thấy trong các bộ phận của cây

trứng cá như hoa, lá, vỏ, rễ. Tuy nhiên, đa phần các hợp chất này kém bền với nhiệt và ánh sáng, do đó cần có các biện pháp trích ly hiệu quả. Phương pháp trích ly có hỗ trợ vi sóng mang lại hiệu quả tích cực trong trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học. Vi sóng dùng sóng điện từ có tần số từ 0.3 GHz đến 300 GHz để tạo chuyển động phân tử trong nguyên liệu dựa vào tương tác ion và tương tác lưỡng cực khiến cho các hợp chất trong nguyên liệu được khuếch tán vào dung môi [4]. Ngày nay, phương pháp chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE), cho thấy nhiều ưu điểm vì thời gian chiết là ngắn, các hợp chất hoạt động mạnh hơn có thể được bảo quản và lượng dung môi sử dụng thấp hơn so với

các phương pháp truyền thống. Các thông số ảnh hưởng đến hiệu suất chiết của MAE là dung môi chiết, thời gian chiết, công suất vi sóng và tỉ lệ DM/NL. Bài báo này thực hiện nghiên cứu quá trình trích ly flavonoid tổng từ lá trứng cá có hỗ trợ vi sóng. Hiệu quả của quá trình được đánh giá dựa trên hai hàm mục tiêu đó là hàm lượng flavonoid xác định bằng phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ và khả năng kháng oxy hóa DPPH.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Lá trứng cá được chọn lựa thu hái ở huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi thu hái, nguyên liệu được loại bỏ tạp chất (đất, sỏi, rác, cành), rửa sạch sấy ở $60^\circ C$ cho đến khi độ ẩm $\leq 10\%$, sau đó xay, nghiền thành bột. Bột lá trứng cá được rây và bảo quản trong túi zipper để sử dụng cho tất cả các thí nghiệm.

2.2. Hóa chất

Nước cất 2 lần (Việt Nam), Methanol (99.5%, Trung Quốc), NaOH (96%, Trung Quốc), $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (97%, Trung Quốc), $NaNO_2$ (99%, Trung Quốc), DPPH (2,2 - diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Wako, Japan), vitamin C (Merck).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly flavonoid có hỗ trợ vi sóng

Thí nghiệm này thực hiện khảo sát các yếu tố gồm: loại dung môi, tỉ lệ DM/NL, công suất và thời gian vi sóng. Tiến hành khảo sát lần lượt các yếu tố bằng cách thay đổi từng yếu tố và giữ các biến khác ở một giá trị cố định. Loại dung môi khảo sát methanol 80%, ethanol 80%, hexan 80% và nước (tỉ lệ DM/NL là 15/1, công suất vi sóng là 700W, thời gian vi sóng là 10 giây); tỉ lệ DM/NL khảo sát 10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1 (loại dung môi được chọn ở thí nghiệm trên, vi sóng ở công suất 700W trong 10 giây); công suất vi sóng khảo sát ở các mức 150W, 300W, 450W, 600W, 750W (loại dung môi và tỉ lệ DM/NL là kết quả ở thí nghiệm trước, thời gian vi sóng là 10 giây) và thời gian vi sóng được khảo sát ở các mức 20 giây, 40 giây, 60 giây, 80 giây, 100 giây (các thông số cố định là kết quả ở các thí nghiệm trước đây). Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba

lần và lấy kết quả trung bình. Kết quả sẽ được kiểm tra với phân tích phương sai (ANOVA) để xác nhận tính hợp lệ. Hàm mục tiêu là lượng TFC và khả năng kháng oxy hóa IC_{50} .

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng tổng flavonoid (TFC) được xác định thông qua phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ trong môi trường kiềm-trắc quang. Chất chuẩn là quercetin được pha ở các nồng độ khác nhau. Cho 1ml dịch trích vào bình có chứa 4ml nước cất, thêm vào 0.3ml $NaNO_2$ 5%, sau 5 phút thêm tiếp 0.3ml dung dịch $AlCl_3$ 10%, sau 6 phút cho vào 2ml NaOH 1M và định mức đến 10ml bằng nước cất. Dung dịch được ủ trong tối 10 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm, quercetin được sử dụng làm chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số miligam quercetin/1 gam mẫu nguyên liệu [5].

2.3.3. Phương pháp xác định khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa các gốc DPPH bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt. Khả năng bắt gốc tự do DPPH được xác định theo phương pháp Brand-Williams và cộng sự với một vài hiệu chỉnh [6]. Chuẩn bị dung dịch DPPH bằng cách pha 0.004mg DPPH trong methanol định mức lên 100ml. Dịch trích được pha thành các nồng độ 10 $\mu g/ml$, 30 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$, 70 $\mu g/ml$, 90 $\mu g/ml$. Cho 5ml dung dịch DPPH đã được chuẩn bị vào bình định mức có chứa 1ml dịch trích ở các nồng độ, ủ tối 30 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 517nm. Dựa vào phần trăm bắt gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình tương quan tuyến tính, từ đó suy ra giá trị IC_{50} (là nồng độ mà tại đó bắt 50% gốc tự do DPPH) để làm cơ sở so sánh khả năng kháng oxy hóa của các mẫu. Mẫu nào có giá trị IC_{50} càng thấp thì khả năng kháng oxy hóa càng cao.

$$DPPH(\%) = \frac{OD_C - OD_M}{OD_C} \times 100$$

Trong đó:

+ OD_C là giá trị đo quang OD của chứng âm

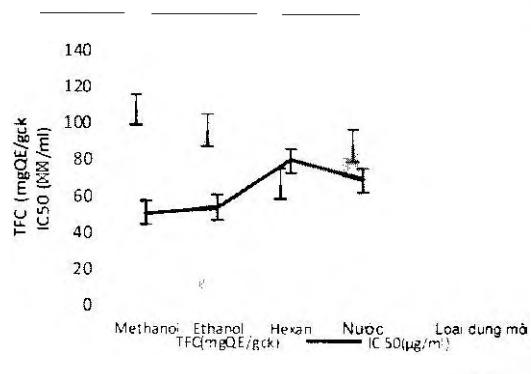
+ OD_M là giá trị đo quang OD của mẫu thử

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa DPPH

Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa được thể hiện ở Hình 1.

Hình 1: Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa DPPH

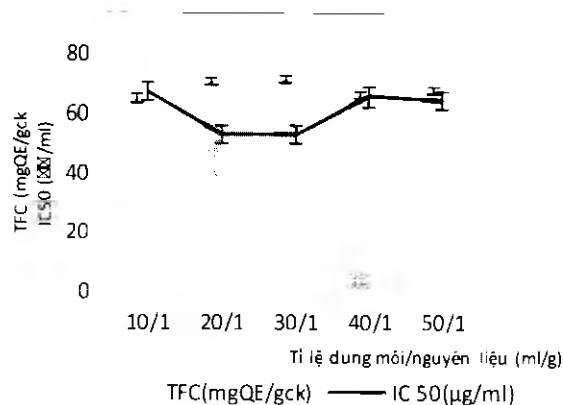


Hình 1 cho thấy loại dung môi trích ly có ảnh hưởng đến hàm lượng cũng như khả năng chống oxy hóa của dịch trích lá trứng cá, đặc biệt là độ phân cực của dung môi. Hàm lượng flavonoid thu được khi trích với methanol 80% và khả năng kháng oxy hóa của dịch trích này là cao hơn các loại dung môi còn lại (TFC là 107.09 mg QE/g chất khô, IC₅₀ là 50.33 µg/ml). Kết quả thu được tương đối phù hợp với Do Q.D. và cộng sự [7]. Từ đó cho thấy, việc sử dụng duy nhất dung môi có độ phân cực cao (nước) hay dung môi kém phân cực (hexan) không cho hiệu quả cao, bởi hợp chất flavonoid rất đa dạng (từ không phân cực đến phân cực). Vì thế cần chọn hệ dung môi phù hợp để trích ly flavonoid từ thực vật (lá trứng cá). Trong thí nghiệm này, dung môi methanol 70% là dung môi thích hợp được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ DM/NL đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa DPPH

Ảnh hưởng của tỉ lệ DM/NL đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa được trình bày ở Hình 2.

Hình 2: Ảnh hưởng của tỉ lệ DM/NL (ml/g) đến hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa DPPH



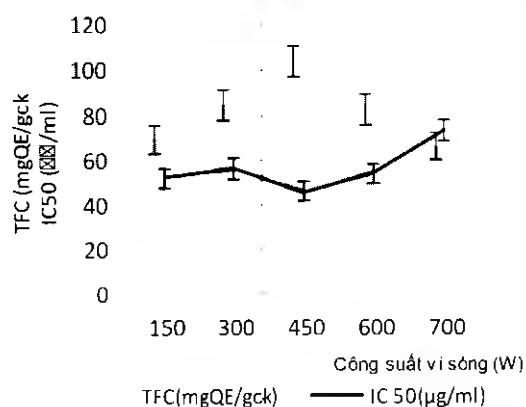
Kết quả ở Hình 2 chỉ ra rằng hàm lượng flavonoid tăng khi tăng tỉ lệ dung môi. Tuy nhiên, giá trị DM/NL ở mức 20/1 thì khả năng kháng oxy hóa cao hơn các tỉ lệ còn lại. Như đã biết, quá trình hòa tan các chất sinh học vào dung môi là quá trình vật lý. Khi lượng dung môi tăng có thể tạo cơ hội các hoạt chất sinh học tiếp xúc với dung môi dẫn đến khả năng thẩm thấu cao hơn. Mặc dù tăng dung môi, lượng flavonoid thu được tăng lên, tuy nhiên tốn nhiều dung môi cũng như thời gian xử lý dung môi. Kết quả nghiên cứu của Cacase và cộng sự chỉ ra rằng tỷ lệ dung môi cao có thể làm một gradien nồng độ tăng, dẫn đến tăng tốc độ khuếch tán cho phép quá trình trích ly chất rắn bằng dung môi tốt hơn, nhưng khi đạt được sự cân bằng hàm lượng flavonoid sẽ không tăng nữa. Do đó, tỉ lệ DM/NL thích hợp được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo là 20/1.

3.3. Ảnh hưởng của công suất vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa DPPH

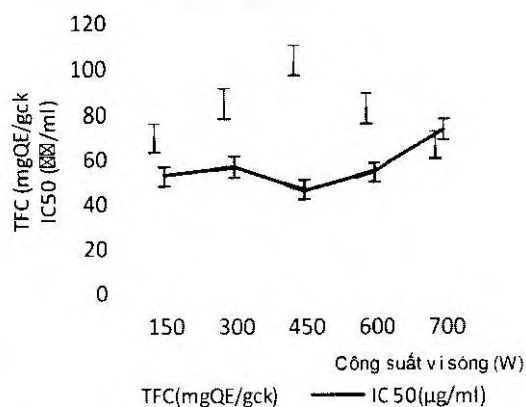
Ảnh hưởng của công suất vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa của dịch trích lá trứng cá được thể hiện ở Hình 3.

Kết quả cho thấy, khi tăng công suất vi sóng từ 150W đến 450W lượng flavonoid thu được tăng đáng kể, đến công suất 600W và 700W hàm lượng có xu hướng giảm. Khả năng kháng oxy hóa của mẫu ở công suất 450W cũng cao hơn các mẫu

Hình 3: Ảnh hưởng của công suất vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa DPPH



Hình 4: Ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa DPPH



còn lại (IC₅₀ là 46.54 µg/ml). Sự gia tăng công suất vi sóng giúp các phân tử nước chuyển động nhanh hơn, phá vỡ tế bào, khuếch tán chất chiết vào dung môi, giúp tăng hiệu quả trích ly. Tuy nhiên, khi công suất vi sóng quá mức, ma sát của các phân tử này tăng lên dẫn đến sự tăng nhiệt độ làm cho một số hợp chất kém bền nhiệt, hợp chất kháng oxy hóa như flavonoid bị phân hủy [8]. Bức xạ vi sóng có thể dễ dàng làm suy giảm các flavonoid do cấu trúc của nó có nhiều nhóm hydroxyl gắn vào vòng thơm. Do đó, công suất vi sóng ở mức 450W là thích hợp để được chọn.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa DPPH

Ảnh hưởng của thời gian vi sóng đến hàm lượng flavonoid và khả năng chống oxy hóa được trình bày trong Hình 4. Hàm lượng flavonoid tăng dần sau khoảng thời gian từ 20 giây đến 40 giây, đến 50 và 60 giây bắt đầu giảm. Trong khoảng khảo sát, hàm lượng flavonoid cao nhất thu được là 127.30mgQE/gck và khả năng kháng oxy hóa cũng cao nhất ở 40 giây. So với các phương pháp trích ly thông thường, trích ly có hỗ trợ vi sóng diễn ra nhanh hơn (vài giây đến vài phút), hạn chế được sự oxy hóa cũng như phân hủy các chất khi trích ly ở nhiệt độ cao trong thời gian dài.

Điều này đặc biệt được chú ý khi trích ly các hợp chất kháng oxy hóa cao và kém bền nhiệt như flavonoid. Thời gian vi sóng kéo dài, quá trình phá vỡ tế bào xảy ra càng nhiều, nghĩa là các hợp chất khuếch tán vào dung môi cũng nhiều.

Tuy nhiên, nếu thời gian quá dài các phân tử dung môi chịu sự ảnh hưởng của vi sóng đủ lâu để gia tăng ma sát dẫn đến nhiệt độ cao làm dung môi bay hơi và các hợp chất nhạy cảm bị phân hủy [9]. Vì thế, việc kéo dài thời gian chỉ có hiệu quả trong một khoảng thời gian nhất định. Trong thí nghiệm này thời gian vi sóng thích hợp để trích ly flavonoid từ lá trứng cá là 40 giây.

4. Kết luận

Chọn dung môi methanol 80% với tỉ lệ DM/NL là 20/1, vi sóng ở công suất 450W trong 40 giây thu được hàm lượng flavonoid là 127.30 mgQE/g chất khô. Khả năng kháng oxy hóa được đặc trưng bằng giá trị IC₅₀ là 54.29 µg/ml gấp 19 lần so với vitamin C và gấp 14 lần so với mẫu sau tinh sạch trích ly bằng phương pháp ngâm kiệt (tuy nhiên thời gian giảm rất đáng kể). Bài báo này là nghiên cứu bước đầu trong việc trích ly flavonoid từ lá trứng cá, tiền đề để nghiên cứu trên các loại nguyên liệu khác hướng đến sản xuất các sản phẩm từ thiên nhiên có lợi cho sức khỏe nhờ hoạt tính chống oxy hóa ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Yasunaka K., Abe F., Nagayama A. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and anthones. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 293-299.
2. Nguyễn Thị Bích và cộng sự (2019). Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và ức chế vi khuẩn gây bội nhiễm mụn trứng cá. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Tập 55, Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2019)(1): 91-97.
3. William Patrick Cruiz Buhian. (2016). Bioactive metabolite profiles and antimicrobial activity of methanolic extracts from *Muntingia calabura* L. leaves and stems. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8). DOI: 10.1016/j.apjtb.2016.06.006.
4. M. Letellier and H. Budzinski (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27, 259-271.
5. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
6. Bran-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28 (1), 25-30.
7. Q. D. Do, A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, et al. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296-302.
8. Altok E., Baygın D., Bayraktar O., Ülkü S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62, 342-348.
9. M. Al-Harashsheh and S. Kingman. (2004). Microwave-assisted leaching - a review. *Hydrometallurgy*, 73, 189- 203.

Ngày nhận bài: 6/6/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 16/6/2020

Ngày chấp nhận đăng bài: 26/6/2020

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN THỊ DIỄM TRINH

2. ThS. NGUYỄN THỊ THU HUYỀN

3. ThS. HOÀNG THỊ NGỌC NHƠN

Khoa Công nghệ Thực phẩm

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

**THE EFFECTS OF MICROWAVE
ON THE TOTAL FLAVONOID EXTRACTION
FROM LEAVES OF *MUNTINGIA CALABURA L.***

● **NGUYEN THI DIEM TRINH**

Faculty of Food Technology,
Ho Chi Minh City University of Food Industry

● Master. **NGUYEN THI THU HUYEN**

Faculty of Food Technology,
Ho Chi Minh City University of Food Industry

● Master. **HOANG THI NGOC NHON**

Faculty of Food Technology,
Ho Chi Minh City University of Food Industry

ABSTRACT:

This study is to determine the total flavonoid extraction conditions from *Muntingia calabura L.* by using the microwave - assisted extraction method and assess the antioxidant capacity of the extract. In this study, the extraction conditions including solvents, material/solvent ratio, microwave power (W) and microwave processing time (seconds) and other factors are based on results of previous researches. This study's objective is the total flavonoid content (TFC, mg/g dry matter), which is determined by Aluminium chloride (AlCl₃) method and DPPH radical scavenging assay capacity method. This study results show that the maximum TFC is 127.30 mg QE/g (dry matter) at 450 W, 40 seconds and the DPPH radical scavenging assay capacity at the IC₅₀ is 54.29 µg/ml.

Keywords: DPPH, flavonoid, microwave, *Muntingia calabura*.