

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CÁC PHÂN ĐOẠN CAO CHIẾT LÁ GIÀ TỪ CÂY BÌNH BÁT NƯỚC

(*Annona glabra* L.)

Huỳnh Thanh Duy*, Lương Phong Dũ, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Đức Độ

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: thanhduyhuynh1997@gmail.com

Nhận bài: 21/08/2019 Hoàn thành phần biên: 11/10/2019 Chấp nhận bài: 25/10/2019

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định sự hiện diện của một số hợp chất hóa học thực vật phổ biến, khảo sát hàm lượng polyphenol, saponin tổng và khả năng kháng oxy hóa của các nghiệm thức cao chiết phân đoạn từ cao chiết ethanol lá già từ cây bình bát nước. Bằng cách sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau như hexane, hỗn hợp hexane: ethyl acetate (tỉ lệ 1:1) và ethyl acetate qua phương pháp tách chiết lỏng - lỏng, các hợp chất có hoạt tính sinh học từ lá bình bát nước (*Annona glabra* L.) được ly trích một cách hiệu quả. Qua phương pháp đo quang phổ UV-Vis với dãy bước sóng từ 215 - 550 nm, các nhóm hợp chất hóa học thực vật như steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin, flavonoid, carotenoid, saponin và alkaloid được phát hiện ở từng phân đoạn. Hàm lượng polyphenol tổng nhiều nhất ở phân đoạn 3 (PD3) đạt 160 mg GAE/g chiết xuất và hàm lượng saponin tổng nhiều nhất ở phân đoạn 2 (PD2) đạt 84,68 mg/g chiết xuất. Khả năng kháng oxy hóa của các nghiệm thức cao chiết được đánh giá qua khả năng khử gốc tự do DPPH, H₂O₂ và ion Fe³⁺. PD3 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 3,34 µg/mL; 49 µg/mL và 19,7 µg/mL cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất và yếu nhất ở PD2 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 70 µg/mL; 199 µg/mL và 102,6 µg/mL. Qua nghiên cứu cũng cho thấy rằng độ phân cực của dung môi ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất thực vật được ly trích và khả năng kháng oxy hóa của cao chiết.

Từ khóa: Cao phân đoạn bình bát nước (*Annona glabra* L.), Hàm lượng polyphenol tổng, Hàm lượng saponin tổng, Khả năng kháng oxy hóa

PHYTOCHEMICAL SCREENING, TOTAL POLYPHENOL AND SAPONIN CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF FRACTIONS FROM *Annona glabra* L. LEAVES BY LIQUID - LIQUID EXTRACTION

Huỳnh Thanh Duy, Lương Phong Dũ, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Đức Độ

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the phytochemicals, total polyphenol and saponin contents and antioxidant activities of ethanol extract of *Annona glabra* L. leaves fractionations. Using liquid/liquid extraction, three fractions were obtained from an ethanol extract of *Annona glabra* L. leaves: n-hexane fraction, n-hexane: ethyl acetate (1:1) fraction, and ethyl acetate fraction. The phytochemical screening in the wavelength ranging from 215 - 550 nm measured by spectrophotometer (UV-Vis) method, confirming the presence of steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin, flavonoid, carotenoid, saponin and alkaloid. The ethyl acetate fraction (PD3) exhibited the highest amount of total polyphenol content (160 mg gallic acid equivalent/g) by using the Folin-Ciocalteu assay. The total saponin content was determined by vanillin/H₂SO₄ method. The n-hexane: ethyl acetate (1:1) fraction (PD2) showed the highest total saponin content (84.68 mg/g). Moreover, PD3 illustrated stronger

antioxidant capacity throughout different activities in scavenging free radical (DPPH, H_2O_2) and reducing power compared with the other fractions. In addition, this study indicated a correlation between the content of notable chemical compounds and antioxidant capacity in solvents with different polarities and ratios. Furthermore, it is suggested that *Annona glabra* L. can be used in dietary applications with a the potential to reduce oxidative stresses.

Keywords: Antioxidant activities, Fractions of *Annona glabra* L. leaves extracts, Total polyphenol content, Total saponin content

1. MỞ ĐẦU

Trong tất cả các các nguồn tài nguyên thiên nhiên, thực vật trong hệ thống y học cổ truyền đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu, báo cáo thường xuyên nhất về tác dụng phòng và trị bệnh (Lumlerdkij và cs., 2018). Hai phần ba các loài thực vật trên thế giới có tầm quan trọng về dược tính và phần lớn trong số đó có tiềm năng kháng oxy hóa (Kasote và cs., 2015).

Stress oxy hóa được định nghĩa là nguyên nhân chính của sự hình thành và phát triển của một số bệnh. Trong đó, thực vật có khả năng sinh tổng hợp một lượng lớn các chất kháng oxy hóa phi enzyme để làm giảm thiệt hại do các phản ứng oxy hóa diễn ra (Kasote và cs., 2015) nhờ vào các hợp chất thực vật có hoạt tính khử gốc tự do như polyphenol, alkaloid, ginsenoside và terpenoid (Awaad và Al-Jaber, 2010; Lu và cs., 2009).

Bình bát nước (*Annona glabra* L.) là một loài thực vật thuộc họ na (Annonaceae), phân bố hoang dã trong tự nhiên và được tìm thấy chủ yếu ở rừng được nhiệt đới thuộc Nam Mỹ (Venezuela), Tây Ấn Độ và Tây Phi (Lim, 2012). Đây là một họ lớn bao gồm hơn 120 chi và 2000 loài (Leboeuf và cs., 1982). Với khả năng trị liệu cao do chứa nhiều hợp chất có khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm (Padmaja và cs., 1995), kháng giun, kháng viêm (Moghadamtousi và cs., 2015), diệt ký sinh trùng, trị tiêu chảy (Pimenta và cs., 2003), sốt rét (Siebra và cs., 2009), kháng lại các tác nhân gây độc tế bào và

loãng xương (Hamid và cs., 2012) nên bình bát nước đã được nghiên cứu trong nhiều thập kỉ qua. Đặc biệt là khả năng ức chế ung thư với nhóm hợp chất acetogenin (Cochrane và cs., 2008). Ngoài ra, trái của các cây họ na (Annonaceae) có thể sử dụng trong thực phẩm do chứa nhiều hàm lượng protein, acid béo, chất xơ, carbohydrate và vitamin (Kumahar, 2009). Tuy nhiên, các nghiên cứu về bình bát nước ở Việt Nam vẫn chưa được công bố rộng rãi. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định sự hiện diện của các nhóm hợp chất thực vật, hàm lượng polyphenol tổng, saponin tổng cũng như khả năng kháng oxy hóa của các phân đoạn cao chiết lá bình bát nước qua phương pháp: khả năng khử gốc tự do DPPH, H_2O_2 và ion Fe^{3+} .

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất

Vật liệu: Lá già bình bát nước (*Annona glabra* L.) được thu hái từ phường Hưng Phú, quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ.

Hóa chất: Các hóa chất cần thiết cho nghiên cứu bao gồm: Ethanol (Việt Nam), hexane (Việt Nam), ethyl acetate (Việt Nam), methanol (Việt Nam), Na_2SO_4 khan (Trung Quốc), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Trung Quốc), H_2SO_4 đậm đặc (Trung Quốc), acid gallic (Trung Quốc), thuốc thử Folin - Ciocalteu (Đức), Na_2CO_3 (Trung Quốc), H_2O_2 30% (Trung Quốc), vitamin C (Trung Quốc) và một số hóa chất khác.

2.2. Điều chế cao chiết

Lá già bình bát nước được xay nhuyễn với dung môi ethanol tỉ lệ 1:5 kết hợp sử dụng sóng siêu âm (Nguyễn Văn Bản và cs., 2018). Sau đó, lọc lấy phần dịch trích và cô quay chân không cho đến khi bay hết dung môi, tiến hành hút chân

không để loại bỏ một phần ẩm độ, thu cao thô. Chiết lỏng - lỏng cao thô lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần (Bảng 1), thu được các cao phân đoạn tương ứng, tiến hành cô quay chân không để thu hồi dung môi và thu cao rắn trữ đông ở -20°C.

Bảng 1. Tỉ lệ dung môi được sử dụng trong điều chế cao chiết

Nghiệm thức	Dung môi	Tỉ lệ dung môi
Cao thô	Ethanol	1:5 (w/v)
PĐ1 (phân đoạn 1)	Hexane:Ethyl acetate	1:0 (v/v)
PĐ2 (phân đoạn 2)	Hexane:Ethyl acetate	1:1 (v/v)
PĐ3 (phân đoạn 3)	Hexane:Ethyl acetate	0:1 (v/v)

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Khảo sát sự hiện diện của các hợp chất thực vật (HCTV)

Xác định sự hiện diện của các HCTV dựa trên các bước sóng hấp thụ: steroid (215 nm), triterpenoid (230 nm), phenolic (255 nm), quinone (260 nm), tannin (265 nm), flavonoid (300 nm), carotenoid (450 nm), saponin (545 nm) và alkaloid (550 nm) theo mô tả của Harborne (1973) có hiệu chỉnh. Các nghiệm thức cao chiết được hòa tan bằng methanol. Mẫu trắng là mẫu chỉ chứa methanol.

2.3.2. Khảo sát hàm lượng polyphenol tổng (TPC) và saponin tổng (TSC)

2.3.2.1. Khảo sát hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

Hàm lượng TPC được xác định dựa theo mô tả của Yadav và Agarwala (2011) có hiệu chỉnh. Cho 0,1 mL dung dịch acid gallic (20 - 120 µg/mL) với 1 mL dung dịch Folin - Ciocalteu 10% vào ống nghiệm, để phản ứng trong vòng 5 phút. Sau đó, thêm vào 1 mL Na₂CO₃ 2%. Sau 45 phút ủ tối, tiến hành ghi nhận độ hấp thụ tại bước sóng 765 nm. Mẫu trắng là methanol. Các nghiệm thức cao chiết cũng được thực hiện tương tự. Acid gallic và cao chiết được hòa tan bằng methanol, hóa chất khác được hòa tan bằng nước khử ion. TPC được tính bằng cách dựa vào phương

trình $y = ax + b$ của đường chuẩn acid gallic.

Hàm lượng polyphenol tổng:

$$C = c.V/m$$

Trong đó, C: hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g chiết xuất); c: giá trị x từ đường chuẩn với acid gallic (µg/mL); V: thể tích dịch chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.3.2.2. Khảo sát hàm lượng saponin tổng (TSC)

Hàm lượng TSC được xác định theo mô tả của Hiai và cs. (1976) có hiệu chỉnh. Cho 500µL chất chuẩn ginsenoside (Rb1, Rg1, Rg3) có nồng độ 10 - 60 µg/mL (được hòa tan bằng methanol 80%) vào ống nghiệm. Thêm vào 200 µL dung dịch vanillin 4% (được pha loãng bằng methanol). Sau đó, thêm vào 1,8 mL H₂SO₄ 70% (được pha loãng bằng nước khử ion) và lắc đều. Ủ hỗn hợp ở 60°C trong 10 phút, sau đó làm lạnh trong 15 phút. Tiến hành ghi nhận kết quả độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng 550 nm. Mẫu trắng là hỗn hợp vanillin 4% và H₂SO₄ 70%. Cao chiết được pha loãng bằng methanol 80% thành nồng độ tương ứng và được tiến hành tương tự. Hàm lượng saponin được tính bằng cách dựa vào phương trình $y = ax + b$ của đường chuẩn ginsenoside.

$$S = \frac{(D - b)}{a.V} \cdot \left(\frac{N}{W}\right)$$

Trong đó, S : Hàm lượng saponin tổng có trong các phân đoạn cao chiết (mg/g chiết xuất); D : Độ hấp thụ của mẫu; a, b : giá trị từ đường chuẩn; V : thể tích của dịch chiết (mL); N : độ pha loãng; W : khối lượng cao chiết có trong thể tích V (mg).

2.3.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa

2.3.3.1. Khảo sát khả năng khử gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Khả năng khử gốc tự do DPPH của các nghiệm thức cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Blois (1958). 1,5 mL dung dịch mẫu được bơm vào ống nghiệm, sau đó thêm 0,5 mL DPPH 0,1 mM. Ủ tối 30 phút ở nhiệt độ phòng, các mẫu được tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Mẫu trắng là methanol. Đối chứng được sử dụng là vitamin C (0,5 – 3 $\mu\text{g/mL}$). Quy trình được thực hiện tương tự đối với các nghiệm thức cao chiết. Các hóa chất và cao chiết được hòa tan bằng methanol. Phần trăm ức chế gốc tự do được tính theo công thức:

Phần trăm ức chế gốc tự do DPPH (%):

$$[(A_0 - A)/A_0] \cdot 100$$

Trong đó, A_0 : Độ hấp thụ của mẫu trắng (không chứa cao chiết); A : Độ hấp thụ mẫu có chứa cao chiết hoặc vitamin C.

2.3.3.2. Khảo sát khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide

Khả năng khử gốc tự do hydrogen peroxide của các nghiệm thức cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Rahate và cs. (2016). Bơm 0,5 mL dung dịch mẫu vào ống nghiệm, tiếp theo bổ sung 2,5 mL dung dịch H_2O_2 4 mM. Để yên 10 phút, các mẫu được tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 230 nm. Đối chứng là vitamin C (50 - 100 $\mu\text{g/mL}$). Quy trình được thực hiện tương tự đối với các nghiệm thức cao chiết. Mẫu trắng không bổ sung H_2O_2 . Các hóa chất và cao chiết được hòa tan bằng đệm phosphate

pH 7,4; 0,05 M. Phần trăm ức chế gốc tự do được tính theo công thức:

Phần trăm ức chế gốc hydrogen peroxide (%):

$$[(A_0 - A)/A_0] \cdot 100$$

Trong đó, A_0 : Độ hấp thụ của mẫu trắng (mẫu không chứa H_2O_2); A : Độ hấp thụ mẫu có chứa cao chiết hoặc vitamin C.

2.3.3.3. Khảo sát năng lực khử

Khả năng khử ion Fe^{3+} của các nghiệm thức cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu (1986) có hiệu chỉnh. Lần lượt cho 90 μL dung dịch vitamin C (1,5 - 4 $\mu\text{g/mL}$) vào ống nghiệm có chứa 225 μL dung dịch đệm phosphate 0,2 M (pH 6,6). Tiếp tục thêm vào 225 μL dung dịch kali ferricyanid 1%. Ủ dung dịch trên ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, bổ sung thêm 225 μL dung dịch trichloroacetic acid 10%. Tiếp đến thêm vào 2125 μL nước khử ion và 125 μL dung dịch ferric chloride 0,1%. Xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 700 nm. Mẫu trắng là nước khử ion. Quy trình được thực hiện tương tự đối với các nghiệm thức cao chiết. Các hóa chất và nghiệm thức cao chiết được hòa tan bằng nước khử ion.

Khả năng khử ion Fe^{3+} của vitamin C và các nghiệm thức cao chiết được tính theo công thức:

$$[(A - A_0)/A_0] \cdot 100$$

Trong đó, A_0 : Độ hấp thụ của mẫu trắng; A : Độ hấp thụ mẫu có chứa cao chiết hoặc vitamin C.

Từ phương trình đường chuẩn $y = ax + b$ xây dựng được từ dãy nồng độ tương ứng với từng nghiệm thức ta suy ra giá trị IC_{50} ở mỗi thí nghiệm.

2.3.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Kết quả thực nghiệm được nhập liệu bằng Microsoft Excel 2010 và phân tích thống

kê bằng phần mềm Minitab version 16. Mỗi thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định Tukey để xác định và so sánh các giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát sự hiện diện của các hợp chất thực vật

Bảng 2. Kết quả định tính các HCTV hiện diện trong cao thô và cao phân đoạn lá bình bát nước (*Annona glabra* L.)

HCTV	Giá trị hấp thụ quang phổ (OD) ở nồng độ 25 µg/mL			
	Cao thô	PD1	PD2	PD3
Steroid	0,393 ± 0,011 ^b	0,220 ± 0,007 ^d	0,393 ± 0,011 ^b	0,614 ± 0,020 ^a
Triterpenoid	0,300 ± 0,014 ^b	0,128 ± 0,008 ^d	0,251 ± 0,002 ^{bc}	0,557 ± 0,030 ^a
Phenolic	0,170 ± 0,001 ^b	0,065 ± 0,001 ^d	0,158 ± 0,002 ^b	0,381 ± 0,002 ^a
Quinone	0,174 ± 0,003 ^b	0,066 ± 0,001 ^c	0,146 ± 0,001 ^c	0,389 ± 0,004 ^a
Tannin	0,168 ± 0,001 ^b	0,060 ± 0,001 ^c	0,136 ± 0,002 ^c	0,369 ± 0,005 ^a
Flavonoid	0,124 ± 0,002 ^b	0,045 ± 0,001 ^d	0,117 ± 0,001 ^b	0,236 ± 0,010 ^a
Carotenoid	0,014 ± 0,001 ^{bc}	0,020 ± 0,002 ^b	0,063 ± 0,004 ^a	0,018 ± 0,003 ^b
Saponin	0,004 ± 0,001 ^c	0,004 ± 0,000 ^{bc}	0,034 ± 0,001 ^a	0,010 ± 0,003 ^b
Alkaloid	0,004 ± 0,000 ^{bc}	0,004 ± 0,000 ^{bc}	0,026 ± 0,001 ^a	0,009 ± 0,002 ^b

* Giá trị OD là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Ở từng hợp chất, các giá trị có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% qua kiểm định Tukey.

Từ số liệu (Bảng 2), khi xét giữa các nhóm HCTV thì steroid và triterpenoid là hai hợp chất có sự hiện diện nhiều nhất và ít nhất là saponin, alkaloid. Khi xét giữa cao thô và cao phân đoạn, ở sáu nhóm chất (steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin và flavonoid), PD3 là phân đoạn có hàm lượng các hợp chất nhiều nhất và ít nhất ở PD1, ở ba nhóm chất còn lại (carotenoid, saponin, alkaloid) cho kết quả khác biệt, PD2 có hàm lượng nhiều nhất và ít nhất ở cao thô và PD1. Các phân đoạn được ly trích với dung môi có độ phân cực tăng dần là hexane, hỗn hợp hexane:ethyl acetate (tỉ lệ 1:1) và ethyl acetate cho thấy dung môi càng phân cực cho khả năng ly trích được càng nhiều các hợp chất thực vật. Theo Zhang (2015), các dung môi khác nhau có sự khác biệt về độ phân cực, độ phân tán và tính thấm có thể sàng lọc được các chiết xuất hóa học thực vật khác nhau. Theo nghiên cứu của Ezealisij và Tamuno-Eli (2017), các bộ phận của loài măng cầu xiêm có sự hiện diện nhiều hợp chất chuyển hóa

Từ kết quả thí nghiệm, các phân đoạn cao chiết đều hiện diện hầu hết các HCTV quan trọng như steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin, flavonoid, carotenoid, saponin và alkaloid và được trình bày trong Bảng 2.

thứ cấp như phenol, tannin, alkaloid, flavonoid và carbohydrate. Như vậy, các nghiệm thức cao chiết lá bình bát nước (*Annona glabra* L.) đều có sự hiện diện của hầu hết các hợp chất thực vật, độ phân cực của dung môi có ảnh hưởng đến sự hiện diện các hợp chất ở mỗi phân đoạn.

3.2. Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol tổng và hàm lượng saponin tổng

Giá trị TPC và TSC trong cao chiết phân đoạn và cao thô lá bình bát nước lần lượt được tính bằng đơn vị mg GAE/g chiết xuất và mg/g chiết xuất, giá trị này càng lớn cho thấy hàm lượng của các hợp chất này trong mẫu càng nhiều. Giá trị TPC trong bảng này được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của acid gallic: $y = 0,0032x - 0,017$; $R^2 = 0,9983$ và giá trị TSC được xác định qua phương trình đường chuẩn của ginsenoside (Rb1, Rg1, Rg3): $y = 0,0144x + 0,0306$; $R^2 = 0,9985$. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Giá trị TPC (mg GAE/g chiết xuất) và TSC (mg/g chiết xuất) có trong cao phân đoạn và cao thô lá bình bát nước (*Annona glabra* L.)

Nghiệm thức	TPC (mg GAE/g chiết xuất)	TSC (mg/g chiết xuất)
Cao thô	94,8 ± 0,6 ^c	48,8 ± 0,4 ^b
PĐ1	60,2 ± 0,8 ^d	81,3 ± 0,8 ^a
PĐ2	137,1 ± 1,6 ^b	84,7 ± 0,8 ^a
PĐ3	160,0 ± 1,4 ^a	44,1 ± 1,4 ^c

* Ở mỗi cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% qua kiểm định Tukey của giá trị trung bình qua ba lần lặp lại

Các phân đoạn cao chiết lá bình bát nước đều có chứa khá nhiều polyphenol (Bảng 3) với hàm lượng dao động từ 60,2 đến 160 mg GAE/g chiết xuất. PĐ3 (cao ethyl acetate) được xác định là nghiệm thức có chứa nhiều hàm lượng polyphenol nhất, lần lượt giảm dần theo thứ tự các nghiệm thức PĐ2 (cao hỗn hợp hexane: ethyl acetate), cao thô (cao ethanol) và ít nhất là PĐ1 (cao hexane). Hàm lượng polyphenol xác định được phù hợp với thí nghiệm khảo sát sự hiện diện các nhóm hợp chất. Cụ thể là qua thí nghiệm định tính, các hợp chất thuộc nhóm polyphenol (steroid, phenolic, tannin, quinone, flavonoid), được xác định nhiều nhất ở PĐ3 và ít nhất ở PĐ1. Ở họ na, vỏ *Anaxagorea dolichocarpa* được ly trích với dung môi hexane, ethyl acetate và ethanol cho hàm lượng polyphenol lần lượt là 5,4; 245,1; 57,13 mg GAE/g chiết xuất. Cũng với các dung môi trên, ở trái *Duguetia chrysocarpa* cho hàm lượng lần lượt là 50,47; 213,11; 191,8 mg GAE/g chiết xuất (Almeida và cs., 2011). Kết quả của đề tài và nghiên cứu trên cũng phù hợp với nhận định của Talla và cs. (2014), dung môi có độ phân cực trung bình (ethyl acetate, ethanol) cho khả năng ly trích hàm lượng polyphenol hiệu quả hơn dung môi không phân cực (hexane).

Qua Bảng 3 cho thấy các phân đoạn cao chiết lá bình bát nước đều có chứa hàm lượng saponin khá nhiều với hàm lượng dao động từ 44,1 đến 84,7 mg/g chiết xuất. Hàm lượng saponin nhiều nhất ở PĐ2, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% với PĐ1 và ít nhất là ở PĐ3. Giá trị hàm

lượng saponin này cũng phù hợp với kết quả định tính khi xác định được hợp chất này nhiều nhất ở PĐ2. Dung môi không phân cực (hexane) và có độ phân cực thấp (hexane: ethyl acetate) ly trích được hàm lượng saponin nhiều hơn dung môi phân cực trung bình (ethyl acetate, ethanol). Điều này được giải thích theo báo cáo của Nag và cs. (2012), ginsenoside có xu hướng lưỡng cực vì chúng có một nhóm hydroxyl (OH) trên mạch carbon nhưng mạch carbon này lại không phân cực, cho nên có thể trong thí nghiệm này mạch carbon không phân cực đã tham gia phản ứng. Ở lá măng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) được ly trích bằng dung môi ethanol 75% sau đó được chiết xuất lại bằng ethyl acetate cho hàm lượng saponin đạt 35,59 mg/g (Shibula và Velavan, 2016). Giá trị này thấp hơn nhiều so với hàm lượng saponin có trong cao chiết lá bình bát nước.

Polyphenol được biết đến là hợp chất kháng oxy hóa. Hợp chất này có thể bảo vệ protein và các vật liệu di truyền khỏi sự phá hủy của các gốc tự do (Gharass, 2009). Saponin được chứng minh là có khả năng chống ung thư (Cinara và cs., 2012). Trong thí nghiệm này đã phát hiện hàm lượng polyphenol và saponin trong lá bình bát nước khá nhiều. Như vậy, ở họ na, để ly trích hiệu quả hàm lượng polyphenol thì dung môi ethyl acetate và hàm lượng saponin thì dung môi không phân cực (hexane) và có độ phân cực thấp (hỗn hợp hexane:ethyl acetate) là phù hợp nhất.

3.3. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết phân đoạn lá bình bát nước (*Annona glabra* L.)

Bảng 4. Giá trị IC₅₀ (µg/mL) của vitamin C và các nghiệm thức cao chiết qua thử nghiệm khử gốc tự do DPPH, hydrogen peroxide và ion Fe³⁺

Nghiệm thức	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)		
	Thử nghiệm với DPPH	Thử nghiệm với hydrogen peroxide	Thử nghiệm khử ion Fe ³⁺
Vitamin C	2,37 ± 0,03 ^d	89,5 ± 0,1 ^c	2,08 ± 0,1 ^c
Cao thô	19,7 ± 0,5 ^c	98,9 ± 0,1 ^b	25,9 ± 1,1 ^b
PD1	42,8 ± 1,2 ^b	95,4 ± 0,3 ^b	98,2 ± 1,8 ^a
PD2	70,0 ± 1,9 ^a	199,3 ± 0,6 ^a	102,6 ± 3,8 ^a
PD3	3,34 ± 0,05 ^d	49,0 ± 0,1 ^d	19,7 ± 1,8 ^b

* Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50%) là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Ở mỗi cột, các giá trị có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% qua kiểm định Tukey

Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết phân đoạn lá bình bát nước được xác định thông qua các thử nghiệm khử gốc tự do DPPH, hydrogen peroxide và ion Fe³⁺ và được thể hiện bằng giá trị IC₅₀ (nồng độ của mẫu mà tại đó có thể ức chế 50% gốc tự do) ở Bảng 4. Giá trị IC₅₀ càng thấp mẫu sẽ có hoạt tính kháng oxy hóa càng mạnh và ngược lại. Giá trị này được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn xây dựng từ dãy nồng độ tương ứng với từng phân đoạn cao chiết. Kết quả cho thấy các nghiệm thức cao chiết đều thể hiện khả năng kháng oxy hóa tương đối mạnh.

Đối với thử nghiệm khử gốc tự do DPPH, đây là một gốc tự do ổn định với một electron tự do chưa ghép cặp trong phân tử. Khi bị khử bởi chất kháng oxy hóa thì màu tím của DPPH sẽ chuyển thành màu vàng (Kedare và cs., 2011). Kết quả cho thấy, PD3 cho khả năng kháng oxy mạnh nhất và yếu nhất ở PD2. Trong đó, PD3 có giá trị IC₅₀ khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với vitamin C ở mức ý nghĩa 1%. Tương tự với đề tài, trái *Duguetia chrysoarpa* (họ na) được ly trích với dung môi hexane, ethyl acetate, ethanol có giá trị IC₅₀ lần lượt là 166,4; 26,97; 79,04 µg/mL với đối chứng vitamin C là 3,91 µg/mL (Almeida và cs., 2011), báo cáo này thể hiện xu hướng kháng oxy hóa mạnh khi ly trích mẫu với dung môi

ethyl acetate, yếu hơn ở ethanol và yếu nhất ở hexane.

Về thử nghiệm khử gốc tự do hydrogen peroxide, sự khác biệt về khả năng khử gốc hydrogen proxide giữa các phân đoạn cao chiết có thể là do các đặc điểm, cấu trúc của các hợp chất có trong chúng ảnh hưởng đến khả năng nhường electron (El-Chaghaby và cs., 2014). Trong các phân đoạn, PD3 cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất và giảm dần theo thứ tự các nghiệm thức PD1, cao thô và yếu nhất ở PD2. Hơn nữa, PD3 cho khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn khoảng 2 lần so với vitamin C và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các phân đoạn còn lại. Theo Nalini và Durairaj (2018), giá trị IC₅₀ ở dịch trích ethanol lá măng cầu xiêm là 153 µg/mL trong khi đối chứng vitamin C là 139 µg/mL. Giá trị này xấp xỉ với giá trị IC₅₀ ở cao thô (chiết xuất ethanol). Giá trị IC₅₀ = 70,06 µg/mL ở chiết xuất methanol lá bình bát với đối chứng vitamin C là 18,85 µg/mL (Jamkhande và cs., 2016) khi thực hiện thí nghiệm với thuốc thử H₂O₂. Kết quả này thấp hơn nhiều lần so với các chiết xuất ở lá bình bát nước được phân tách bằng nhiều dung môi khác nhau trong đề tài này.

Với thử nghiệm khử ion Fe³⁺, chất kháng oxy hóa làm giảm phức hợp (Fe³⁺) ferricyanide thành ferrous (Fe²⁺) bằng cách

nhường một electron, màu của dung dịch thử thay đổi từ màu vàng sang các trạng thái khác nhau của xanh lá cây và xanh dương (Elumalai và Parameswaran, 2012). Trong các phân đoạn, cụ thể là với giá trị $IC_{50} = 19,7 \mu\text{g/mL}$, PD3 cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất và khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với cao thô nhưng lại khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các phân đoạn còn lại. Với chiết xuất bằng dung môi methanol và nước từ thịt măng cầu ta (*Annona squamosa* L.), cho năng lực khử 50% ion Fe^{3+} lần lượt là 59 và 46 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ascorbic acid (Elumalai và Parameswaran, 2012). Trong khi ở thí nghiệm này, với dung môi hexane, hỗn hợp ethyl acetate: hexane (1:1) và ethyl acetate ở lá bình bát nước có năng lực khử lần lượt là 47; 49,1; 9,4 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ascorbic acid. Như vậy, khả năng khử Fe^{3+} trong cao chiết phân đoạn lá bình bát nước hiệu quả hơn hẳn so với báo cáo trên.

Qua 3 thử nghiệm trên thì PD3 (cao ethyl acetate) cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất và yếu nhất ở PD2 (cao hexane: ethyl acetate:1 :1). Theo nghiên cứu của Almeida và cs. (2011), polyphenol là hợp chất quan trọng nằm trong số các nhóm hợp chất có khả năng kháng oxy hóa. Bên cạnh đó, hợp chất triterpenoid (myricarin C, myricarin A và myricarin B) được Xu và cs. (2017) công bố có hoạt tính khử gốc tự do. Và đây cũng là những hợp chất hiện diện nhiều trong các chiết xuất lá Bình bát nước, đặc biệt qua thí nghiệm khảo sát sự hiện diện các HCTV và định lượng hàm lượng polyphenol tổng thì PD3 chiếm ưu thế về các hợp chất này hơn các phân đoạn khác. Mặc dù kết quả định lượng polyphenol cho thấy hàm lượng chất này có trong PD2 nhiều hơn PD1 nhưng ở thí nghiệm khả năng kháng oxy thì PD1 lại cho khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn. Hiện tượng này đã được giải

thích bởi Tan và cs. (2011), mối quan hệ giữa các hợp chất kháng oxy hóa và khả năng kháng oxy hóa thường rất phức tạp. Khả năng kháng oxy hóa không chỉ phụ thuộc vào lượng chất kháng oxy hóa mà còn dựa vào cấu trúc và sự tương tác lẫn nhau. Do đó, hàm lượng polyphenol hoặc flavonoid tồn tại nhiều không nhất thiết thể hiện khả năng kháng oxy hóa mạnh mà còn dựa trên các nhóm chất khác như carotenoid, vitamin và chất khoáng. Bên cạnh đó, để giải thích thêm cho hiện tượng này thì theo báo cáo của Odabasoglu và cs. (2005), hoạt tính kháng oxy hóa của một số chiết xuất có thể là do sự hiện diện của các hợp chất non-phenolic. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng polyphenol có thể có hoạt tính kháng oxy hóa riêng biệt hoặc có thể ức chế hoặc cộng gộp giữa polyphenol và các hợp chất khác như carbohydrate, protein. Ở thí nghiệm định lượng, hàm lượng saponin trong PD1 và PD2 vượt trội hơn so với các nghiệm thức còn lại nhưng khả năng kháng oxy hóa ở hai nghiệm thức này thì yếu hơn. Khả năng kháng oxy hóa của ginsenoside được thể hiện thông qua gốc đường gắn vào các vị trí khác nhau trên mạch triterpen, đây là một chỉ số về mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt động (Chae và cs., 2010). Mỗi ginsenoside Re, Rd, R1 là những chất kháng oxy hóa vì gốc đường gắn vào vị trí 20 trên mạch triterpen, ngược lại những chất tiền oxy hóa như Rg3, Rh2 và Rg2 thì không có gốc đường gắn vào vị trí này (Lu và cs., 2009). Theo báo cáo của Lee và cs. (2016), khả năng kháng oxy của ginsenoside Rg1 không tỉ lệ thuận với hàm lượng chất này có trong mẫu và cũng không tìm thấy sự tương quan nào. Xét theo cấu trúc hóa học, ginsenoside không giàu điện tử như các hợp chất polyphenol (hợp chất được ổn định bởi sự di chuyển cộng hưởng của các electron chưa ghép cặp bao gồm trên mạch vòng). Do đó, có lẽ ginsenoside là chất kháng oxy yếu vì hợp chất này

không dễ dàng thực hiện phản ứng nhường electron một cách hiệu quả với tác nhân oxy hóa (Chae và cs., 2010).

Qua khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa ở các cao phân đoạn lá bình bát nước bằng các phương pháp khử gốc tự do DPPH, khử gốc hydro peroxide và năng lực khử thì PD3 (cao ethyl acetate) cho khả năng kháng oxy hóa mạnh nhất.

4. KẾT LUẬN

Lá già bình bát nước (*Annona glabra* L.) khi ly trích với các dung môi có độ phân cực tăng dần: hexane, hexane: ethyl acetate (tỉ lệ 1:1) và ethyl acetate đều xuất hiện hầu hết các hợp chất thực vật đã khảo sát như steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin, flavonoid, carotenoid, saponin và alkaloid. Hàm lượng polyphenol nhiều nhất khi được ly trích với dung môi ethyl acetate. Ngược lại, hàm lượng saponin nhiều nhất khi được ly trích với dung môi hexane:ethyl acetate. PD3 (cao ethyl acetate) có khả năng kháng oxy mạnh nhất qua 3 thử nghiệm kháng oxy hóa với DPPH, H₂O₂ và năng lực khử. Nghiên cứu này cũng thể hiện rằng cao chiết lá bình bát nước là một nguồn nguyên liệu kháng oxy hóa thiên nhiên đầy tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp và dược phẩm và cần được khảo sát thêm trong các thử nghiệm kháng viêm, kháng virus và kháng khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Văn Bản, Huỳnh Thanh Duy, Trần Hải Dương, Trần Thị Tuyết Nhung, Thạch Trọng Nghĩa, Nguyễn Đức Độ và Huỳnh Ngọc Thanh Tâm. (2018). Khảo sát hàm lượng polyphenol, saponin, hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn từ cao chiết bẹ và củ rễ cây Môn ngứa (*Colocasia esculenta*). *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 2(3), 831-838.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Almeida, J. R. G. S., Oliveira, M. R., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Ribeiro, L. A. A., Lúcio, A. S. S. C., & Quintans-Júnior, L. J.

- (2011). Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 367-374.
- Awaad, A. S., & Al-Jaber, N. A. (2010). Antioxidant natural plant. *RPMP Ethnomedicine: Source & Mechanism*, 27, 1-35.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Chae, S., Kang, K. A., Youn, U., Park, J. S., & Hyun, J. W. (2010). A comparative study of the potential antioxidant activities of ginsenosides. *Journal of food biochemistry*, 34, 31-43.
- Cinara V. da Silva, Fernanda, M. B., & Eudes, S. V. (2012). *Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity*. Brazil: Federal University of Bahia.
- Cochrane, C.B., Nair, P. K., Melnick, S.J, Resek, A.P., & Ramachandran, C. (2008). Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. *Anticancer Research*, 28(2A), 965-71.
- El-Chaghaby, G. A., Ahmad, A. F., & Ramis, E. S. (2014). Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(2), 227-233.
- Elumalai, N., & Parameswaran, I. (2012). In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) Fruit Pulp. *J Acupunct Meridian Stud*, 6(3), 142-148.
- Gharass E. H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512–2518.
- Hamid, R. A., Foong, C. P., Ahmad, Z. & Hussain, M. K. (2012). Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 630-641.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. America: Springer Publishing.
- Hiai, S., Oura, H., & Nakajima, T. (1976). Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(2), 116-22.
- Jamkhande, P. G., Wattamwar, A. S., Kankudte, A. D., Tidke, P. S., & Kalaskar, M. G. (2016).

- Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for invitro antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. *Alexandria Journal of Medicine*, 52(1), 19-25.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Kumhar, D. S. (2009). Effect of antioxidants and storage temperatures on browning and quality of custard Apple (*Annona squamosa* L.) pulp, Doctoral dissertation, Maharana Pratap University of Agriculture and Technology, Udaipur.
- Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B. & Mukherjee, R. (1982). The phytochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12), 2783-2813.
- Lee, J. W., Mo, E. J., Choi, J. E., Jo, Y. H., Jang, H., Jeong, J. Y., ... & Lee, M. K. (2016). Effect of Korean Red Ginseng extraction conditions on antioxidant activity, extraction yield, and ginsenoside Rg1 and phenolic content: optimization using response surface methodology. *Journal of ginseng research*, 40(3), 229-236.
- Lim, T. K. (2012). *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Dordrecht: Springer.
- Lu, J. M., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Current vascular pharmacology*, 7(3), 293-302.
- Lumlerdkij, N., Tantiwongse, J., Booranasubkajorn, S., Boonrak, R., Akarasereenont, P., Laohapand, T., & Heinrich, M. (2018). Understanding cancer and its treatment in Thai traditional medicine: An ethnopharmacological-anthropological investigation. *Journal of ethnopharmacology*, 216, 259-273.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625-15658.
- Nag, S. A., Qin, J., Wang, W., Wang, M. H., Wang, H., & Zhang, R. (2012). Ginsenosides as anticancer agents: in vitro and in vivo activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Frontiers in pharmacology*, 3, 25.
- Nalini & Durairaj. (2018). In vitro free radical scavenging potential of hydroethanolic extract in the leaves of *Annona muricata*. *International Journal of Green Pharmacy*, 12(1), S280.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., & Halici, M. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76(2), 216-219.
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315.
- Padmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y., & Hisham, A. (1995). Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 21-24.
- Pimenta, L.P.S., Pinto, G.B., Takahashi, J.A., Silva, L.G.F., & Boaventura, M.A.D. (2003). Biological screening of Annonaceus Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, 10, 209-212.
- Rahate, K.P., Padma R., Parkavi N.G. & Renjith V. (2013). Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 73-77.
- Shibula, K., & Velavan, S. (2016). Determination of bioactive compounds in *Annona muricata* leaf extract. *J Bioscience and Technology*, 7(3), 726-768.
- Siebra, C. A., Nardin, J. M., Florão, A., Rocha, F. H., Bastos, D. Z., Oliveira, B. H. & Weffort-Santos, A. M. (2009). Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 19(1), 82-88.
- Talla, E., Tamfu, A. N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F. P., Mbafor, J. T., & Ndjouenkeu, R. (2014). Phytochemical screening, antioxidant activity, total polyphenols and flavonoids content of different extracts of propolis from Tekel (Ngaoundal, Adamawa region,

- Cameroon). *The Journal of Phytopharmacology*, 3(5), 321-329.
- Tan, P. W., Tan, C. P., & Ho, C. W. (2011). Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal*, 18(2).
- Xu, H., Yuan, Z. Z., Ma, X., Wang, C., Suo, Y. R., Wang, H. L., ... & Bai, B. (2017). Triterpenoids with antioxidant activities from *Myricaria squamosa*. *Journal of Asian natural products research*, 20(3), 292-298.
- Yadav, R., & Munin, A. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12), 10-14.
- Zhang, Q. (2015). Effects of extraction solvents on phytochemicals and antioxidant activities of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *European Journal of Food Science and Technology*, 3(5), 15-21.