

Ảnh hưởng của các điều kiện chiết tách đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá cây Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* Linn.)

Nguyễn Văn Thủy^{1,*}, Nguyễn Ngọc Quý¹, Phạm Văn Thịnh¹, Nguyễn Minh Tiến²,
Nguyễn Thị Ngọc Quyên¹, Lê Văn Minh³, Nguyễn Thị Xuân Liễu², Nguyễn Thị Thùy Trang²,
Nguyễn Thanh Tố Nhi², Huỳnh Linh Ty²

¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

³Trung tâm Sâm và Dược liệu Tp. Hồ Chí Minh, Viện Dược Liệu

*nvthuy@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Mãng cầu xiêm là cây ăn quả được trồng rộng rãi ở nước ta với qui mô công nghiệp. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm trồng tại Bến Tre. Những nhân tố ảnh hưởng đến quá trình chiết bao gồm: Nồng độ ethanol, thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng được xác định bằng phương pháp so màu. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, điều kiện chiết xuất thích hợp là: Dung môi chiết ethanol 40%, thời gian 30 phút, nhiệt độ 60°C và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30g/ml. Theo đó, hàm lượng TPC và TFC đạt lần lượt là $94,541 \pm 1,082$ mgGAE/g và $26,170 \pm 0,288$ mgQE/g. Những kết quả nghiên cứu này góp phần cung cấp những dẫn liệu khoa học quý giá về cây Mãng cầu xiêm.

Nhận 08.08.2019

Được duyệt 28.02.2020

Công bố 30.03.2020

Từ khóa

Mãng cầu xiêm,
Annona muricata L.,
polyphenol, flavonoid

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Hiện nay, cây Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Với kết quả thu được từ các nghiên cứu tập trung theo hướng nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào, Mãng cầu xiêm được xem như là một dược liệu đầy tiềm năng trong điều trị ung thư[1], cũng như công dụng nổi bật như khả năng kháng khuẩn[2], kháng vi-rút[3], lợi tiểu[4] và khả năng chống oxy hóa[5]. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về Mãng cầu xiêm còn khá khiêm tốn, trong khi loài thực vật này được trồng phổ biến và đem lại hiệu quả kinh tế cao. Ngoài quả, các bộ phận khác của cây hầu như không được tận dụng.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của điều kiện chiết xuất đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm trồng tại Bến Tre. Từ đó đề ra điều kiện tách chiết thích hợp. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp dữ liệu khoa học về điều kiện chiết xuất để thu được hàm lượng tối ưu polyphenol và flavonoid tổng từ lá Mãng cầu xiêm.

2 Thực nghiệm

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu để nghiên cứu là lá Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) được thu thập vào tháng 1 năm 2019 tại huyện Tân Phú Đông, tỉnh Bến Tre. Nguyên liệu được làm khô dưới ánh nắng tự nhiên cho đến khi độ ẩm đạt khoảng 10%, sau đó được cắt nhỏ bằng máy xay bột dược liệu (Super Blender, QE-500, Trung Quốc) và sàng qua rây mắt lưới ($\theta = 1\text{mm}$) để thu được mẫu có kích thước đồng nhất. Mẫu này được bao gói hút chân không và bảo quản ở -20°C trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

2.2 Hóa chất nghiên cứu

Acid gallic chuẩn (98%) và quercetin chuẩn (98%) được mua tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TPHCM. AlCl_3 , CH_3COOK , Na_2CO_3 , thuốc thử Folin-Ciocalteu và ethanol mua từ hãng Merck (Đức). Tất cả hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều đạt hạng phân tích.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Thiết kế thí nghiệm



Trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến khả năng tách chiết các hợp chất polyphenol và flavonoid tổng, 1g mẫu được chiết xuất theo phương pháp chiết hồi lưu theo nồng độ dung môi, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ, thời gian tách chiết khác nhau. Các thí nghiệm sau kế thừa các kết quả của các thí nghiệm trước. Khuấy mẫu trên bếp từ với tốc độ 300rpm trong suốt quá trình chiết. Khi quá trình chiết kết thúc, li tâm hỗn hợp với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch trong thu được dùng để xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng.

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm được nghiên cứu ở các nồng độ 0, 20, 40, 60, 80, 100%. Các thông số khác cố định bao gồm: nhiệt độ chiết ở 50°C, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết là 1/20(g/ml) và thời gian chiết tách 60 phút. Nồng độ ethanol thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng cộng cao nhất. Cố định thông số này để nghiên cứu các thông số còn lại.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm được thực hiện ở 30, 40, 50, 60, 70 và 80°C. Các thông số cố định gồm: nồng độ dung môi, thời gian chiết 60 phút và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết 1/20 (g/ml). Nhiệt độ chiết thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng. Sau khi xác định được nhiệt độ chiết thích hợp, cố định thông số này để nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết.

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được nghiên cứu ở các mức 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 và 1/60 (g/ml). Các thông số cố định gồm: nồng độ dung môi, thời gian chiết 60 phút và nhiệt độ chiết. Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng. Cố định thông số này để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian chiết.

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm được nghiên cứu ở các mốc thời gian 15, 30, 45, 60, 90 và 120 phút. Các thông số khác cố định bao gồm: nồng độ dung môi, nhiệt độ chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi kế thừa từ các thí nghiệm trước. Thời gian chiết thích hợp được lựa chọn dựa vào hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

2.3.1 Xác định hàm lượng phenolic tổng số (TPC)

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu dựa theo mô tả của Phạm và các cộng sự[6]. Tiến hành pha loãng dung dịch với nồng độ phù hợp (dịch thu được ở phần chiết mẫu). Sau đó, hút 0,5ml dung dịch mẫu đã pha loãng vào ống nghiệm. Thêm vào 2,5ml dung dịch Folin-Ciocalteu 10% và đồng nhất bằng máy Vortex, để dung dịch phản ứng trong 5 phút. Tiếp tục, thêm 2,0ml dung dịch Na₂CO₃ 7,5% và lắc đều. Để dung dịch ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 1 giờ. Sau đó đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 765nm trên máy quang phổ UV-Vis.

Hàm lượng polyphenol được biểu diễn theo miligam đương lượng acid gallic trong 1g chất khô (mgGAE/g chất khô).

2.3.2 Xác định hàm lượng flavonoid tổng số (TFC)

Hàm lượng flavonoid tổng được xác định dựa theo phương pháp của Mahboubi và các cộng sự[7]. Tiến hành pha loãng dung dịch với nồng độ phù hợp (dịch thu được ở phần chiết mẫu). Hút 0,5ml dung dịch mẫu đã pha loãng vào ống nghiệm, sau đó thêm vào 0,1ml dung dịch AlCl₃ 10%. Tiếp tục thêm vào 0,1ml dung dịch CH₃COOK 1M và 4,3ml nước cất, lắc đều. Để dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 415nm trên máy quang phổ UV-Vis. Quercetin được dùng làm chất chuẩn. Hàm lượng flavonoid tổng được biểu diễn theo miligam đương lượng quercetin trong 1g chất khô (mgQE/g chất khô).

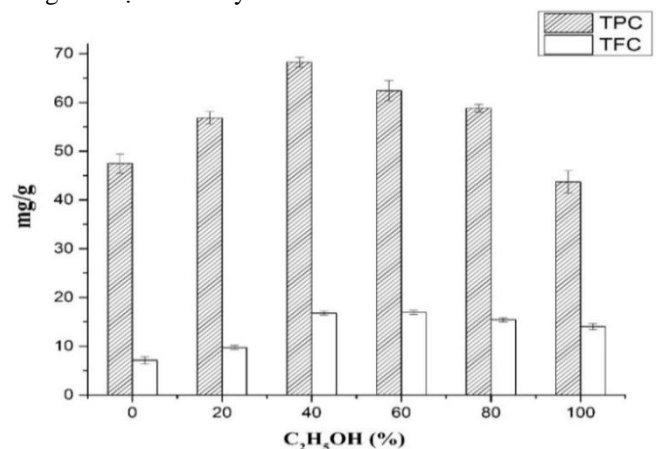
2.3.3 Phương pháp xử lí số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần để đảm bảo tiến hành phân tích ANOVA. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lí số liệu thống kê chuyên dụng Statistica 8.0 (Stasoft, Tulsa, Ok, USA). Kiểm định Tukey được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa P < 0,05.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

Trên thế giới, người ta đã sử dụng aceton, ethylacetate, ethanol, methanol và hỗn hợp methanol để tách chiết polyphenol. Tuy nhiên, để ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm, ethanol lại thường được sử dụng vì đây là loại dung môi an toàn[8]. Trong thí nghiệm này, dung môi ethanol được sử dụng với nồng độ khác nhau: 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, và 100% (v/v). Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/20 (g/ml), nhiệt độ chiết ở 50°C và thời gian chiết trong 60 phút. Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số được trình bày ở Hình 1.

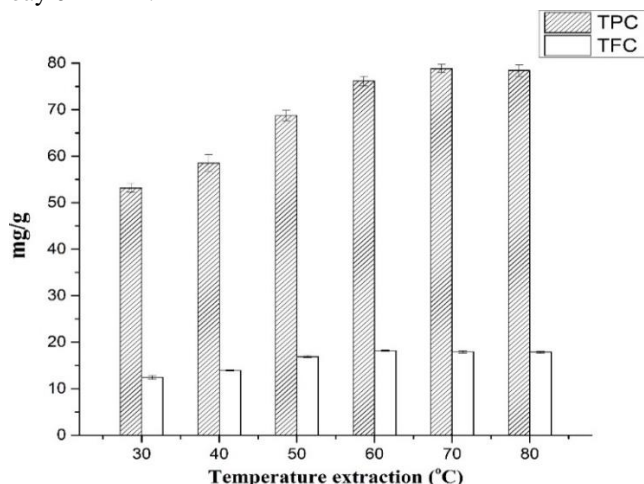


Hình 1 Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của lá Mãng cầu xiêm chiết bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau

Hàm lượng polyphenol (TPC) và flavonoid tổng (TFC) tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở nồng độ ethanol 40% ($68,239 \pm 1,015\text{mgGAE/g}$ và $16,789 \pm 0,348\text{mgQE/g}$), sau đó có xu hướng giảm dần. Mức độ phân cực của dung môi tùy thuộc vào hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro, trong đó, nước có hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro cao hơn ethanol. Do đó, khi trộn lẫn ethanol với nước sẽ cho các hỗn hợp ethanol - nước có mức độ phân cực khác nhau. Kết quả trên chứng tỏ rằng thành phần polyphenol và flavonoid trong lá Mãng cầu xiêm bị ảnh hưởng bởi mức độ phân cực của dung môi. Vì vậy nồng độ ethanol 40% được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

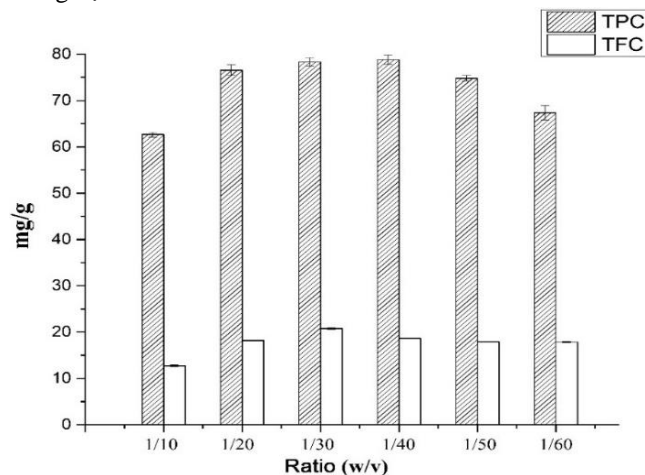
Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất trích li và hoạt chất sinh học của dịch chiết. Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành chiết polyphenol và flavonoid tổng ở các nhiệt độ khác nhau: 30°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C và 80°C . Nồng độ ethanol 40%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/20 (g/ml) và thời gian chiết trong 60 phút. Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số được trình bày ở Hình 2.



Hình 2 Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của lá Mãng cầu xiêm khi được chiết ở các nhiệt độ khác nhau

Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng TPC có xu hướng tăng dần khi nhiệt độ chiết xuất tăng. Cụ thể hàm lượng TPC của lá Mãng cầu xiêm tăng nhanh khi tăng nhiệt độ từ 30°C tới 60°C , sau đó hàm lượng TPC tiếp tục tăng nhưng không đáng kể. Trong khi đó hàm lượng TFC đạt tối đa tại 60°C với giá trị $18,194 \pm 0,093\text{mgQE/g}$. Nhiệt độ càng cao, sự linh động của các cấu tử tăng lên, các cấu tử trong hỗn hợp sẽ chuyển động hỗn loạn do tăng vận tốc chuyển động, làm cho quá trình khuếch tán trở nên dễ dàng hơn và giảm độ nhớt của nguyên liệu; đồng thời nước sẽ dễ dàng xuyên qua lớp nguyên liệu, làm cho diện tích tiếp xúc bề mặt giữa nguyên liệu và nước sẽ càng lớn, vì vậy làm tăng hiệu suất chiết tách. Hơn nữa, nhiệt độ còn làm biến tính và phá hủy màng tế bào nhờ các bọt khí tạo thành cũng làm cho quá trình chiết tách

trở nên dễ dàng hơn. Vì vậy chọn nhiệt độ chiết 60°C cho các thí nghiệm sau.



Hình 3 Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm ở các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau

3.3 Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

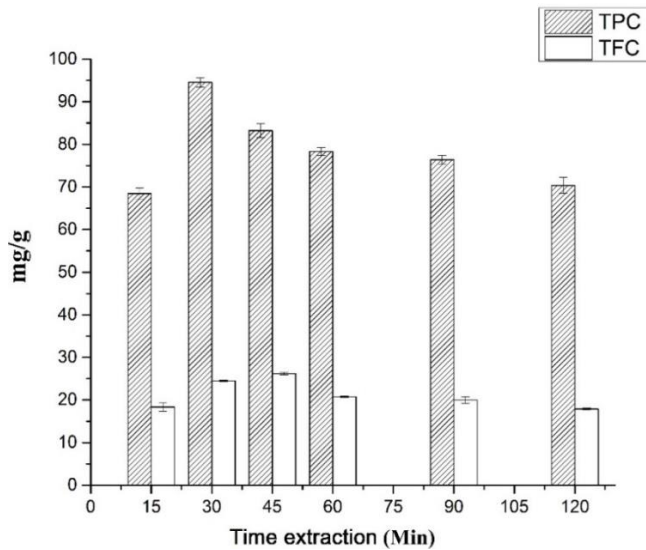
Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là yếu tố không chỉ ảnh hưởng đến hiệu suất trích li mà còn ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế và quá trình tinh sạch về sau. Trong thí nghiệm ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, ethanol được sử dụng ở nồng độ 40%, nhiệt độ chiết 60°C , thời gian chiết trong 60 phút và chiết xuất ở những tỉ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau: 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60 (g/ml). Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số được trình bày ở Hình 3.

Kết quả khảo sát cho thấy, lượng dung môi càng nhiều thì hàm lượng TPC và TFC càng tăng, nhưng đến tỉ lệ nhất định thì hàm lượng tăng không đáng kể và giảm dần khi lượng dung môi quá lớn. Nguyên nhân của sự thay đổi trên là do khi lượng dung môi quá ít (ở tỉ lệ 1/10) không đủ để hòa tan, trích li hết lượng polyphenol và flavonoid ra khỏi tế bào. Do đó, khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì hàm lượng polyphenol và flavonoid thu được có sự tăng mạnh. Tuy nhiên, khi ngâm chiết với lượng dung môi quá nhiều, trong khi hàm lượng polyphenol của nguyên liệu là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha, làm hiệu quả trích li polyphenol không tăng. Do đó ta chọn tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/ml) cho những thí nghiệm sau.

3.4 Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số

Thời gian trích li là yếu tố không những ảnh hưởng đến hiệu suất trích li mà còn ảnh hưởng đến chi phí và đặc biệt là chất lượng của dịch chiết. Chúng tôi tiến hành chiết xuất polyphenol và flavonoid trong những thời gian như sau: 15, 30, 45, 60, 90 và 120 phút. Nồng độ ethanol 40%, nhiệt độ chiết 60°C và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/ml). Kết

quả phân tích hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số được trình bày ở Hình 4.



Hình 4 Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm ở những thời gian chiết xuất khác nhau

Xác định thời gian của quá trình trích li là cần thiết để lấy hầu hết các hợp chất sinh học mong muốn. Thường, đây sẽ là thời điểm cân bằng giữa bên trong và bên ngoài tế bào được thiết lập. Nếu thời gian trích li ngắn, lượng các hoạt chất sinh học không trích li hoàn toàn, nhưng nếu thời gian quá dài các hoạt chất sẽ bị oxy hóa, chất lượng và số lượng

các hoạt chất sẽ giảm. Kết quả khảo sát cho thấy, hàm lượng TPC đạt cao nhất $94,541 \pm 1,082\text{mgGAE/g}$ trong thời gian chiết xuất 30 phút và hàm lượng TFC đạt cao nhất $26,170 \pm 0,288\text{mgQE/g}$ trong thời gian chiết xuất 45 phút. Tuy nhiên, do lượng TPC giảm khá nhiều trong khoảng từ 30 tới 45 phút chiết xuất nên ta chọn thời gian tối ưu cho nghiên cứu này là 30 phút.

4 Kết luận

Điều kiện tách chiết thích hợp để thu được hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của lá Mãng cầu xiêm được xác định như sau: Dung môi chiết xuất là ethanol 60%, thời gian chiết xuất trong 30 phút, nhiệt độ chiết xuất ở 60°C và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi sử dụng là 1/30(g/ml). Theo đó, hàm lượng TPC và TFC đạt lần lượt là $94,541 \pm 1,082\text{mgGAE/g}$ và $26,170 \pm 0,288\text{mgQE/g}$.

Những phát hiện trong nghiên cứu này chỉ ra tiềm năng sử dụng cây Mãng cầu xiêm như một nguồn chiết xuất các hợp chất có tiềm năng chống oxy hóa tự nhiên để nâng cao khả năng ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng. Kết quả này có thể được xem như những báo cáo đầu tiên về hoạt tính chống oxy hóa của cây Mãng cầu xiêm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2019.01.17/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Almudena Bermejo, Bruno Figadère, Maria-Carmen Zafra-Polo, Isabel Barrachina, Ernesto Estornell and Diego Cortes (2005), "Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action", *Nat. Prod. Rep.*, 22, 269-303
2. Oberlies, N. H., Croy, V. L., Harrison, M. L., McLaughlin, J. L. (1997), "The Annonaceous acetogenin bullatacin is cytotoxic against multidrug-resistant human mammary adenocarcinoma cells", *Cancer Lett*, 115, 73-9.
3. Padma, P., Pramod, N.P., Thyagarajan, S.P., Khosa, R. L. J. (1998), "Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus", *Ethnopharmacol*, 61, 81-3.
4. Quisumbing, E. (1951). *Medicinal plants of the Philippines*. Manila: Katha Publishing.
5. Adewole, S. O., Caxton-Martins, E. A., Afr, J. (2006), "Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic B-cells of streptozotocin-treated diabetic rats", *Biomed. Res*, 9, 173-87.
6. Pham H N T, Nguyen V T, Vuong Q V, Bowyer M C, Scarlett C J (2016), "Bioactive compound yield and antioxidant capacity of *Helicteres hirsuta* Lour. stem as affected by various solvents and drying methods", *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e12879
7. Mahboubi M, Kazempour N and Nazar AR (2013), "Total phenolic, total flavonoids, antioxidant and antimicrobial activities of *Scrophularia striata* Boiss extracts", *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8, 15-19
8. Singleton V. L., Joseph A., Rossi J. R. J. A., (1965), "Colorimetry of total phenolics withphosphomolybdic-phosphotungstic acidreagents". *Am. J. Enol. Viticulture*, 16: 144-158

Effect of extraction conditions on total polyphenol and flavonoid content of Soursop leaves (*Annona muricata* Linn.)

Nguyen Van Thuy^{1,*}, Nguyen Ngoc Quy¹, Pham Van Thinh¹, Nguyen Minh Tien², Nguyen Thi Ngoc Quyen¹,
Le Van Minh³, Nguyen Thi Xuan Lieu², Nguyen Thi Thuy Trang², Nguyen Thanh To Nhi², Huynh Linh Ty²

¹Nguyen Tat Thanh Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

²Department of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

³Research Center of Ginseng and Medicinal Material (CGMM), National Institute of Medicinal Materials, Ho Chi Minh
vnthuy@ntt.edu.vn

Abstract Soursop is a fruit tree that is widely grown on an industrial scale. This study was conducted to assess the effect of the conditions of extraction of total polyphenol and flavonoid content of leaves of Soursop grown in Ben Tre. Factors affecting the extraction process include: Ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and material ratio/extraction solvent. Total polyphenol and flavonoid content was determined by colorimetric method. The most efficient extraction conditions were as follows: extracting solvent 40% ethanol, sample-to-solvent ratio 1/30 (g/ml), extraction contact time 30 min and extraction temperature 60°C with values of $94,541 \pm 1,082$ mgGAE/g DW and $26,170 \pm 0,288$ mgQE/g DW for the total phenolic content and the total flavonoid content, respectively. These research results contribute to providing valuable scientific data about Soursop.

Keywords Soursop, *Annona muricata* L., polyphenols, flavonoids