

Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu quả thu nhận hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết lá ổi (*Psidium guajava* L.)

Lê Thanh Ninh, Nguyễn Thị Tình, Bùi Thị Thu Huyền, Đỗ Như Quỳnh, Vi Đại Lâm, Nguyễn Tiên Dũng*

Khoa Công nghệ Sinh học - Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, phường Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2023; ngày chuyển phản biện 2/3/2023; ngày nhận phản biện 27/3/2023; ngày chấp nhận đăng 30/3/2023

Tóm tắt:

Lá ổi (*Psidium guajava* L.) được ghi nhận là nguồn hợp chất tự nhiên đa dạng với những hoạt tính có lợi cho sức khỏe. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng các hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá ổi. Ethanol 70%, methanol 70% và nước nóng là các dung môi được lựa chọn. Hàm lượng phenolic tổng (TPC) và hàm lượng flavonoid tổng (TFC) được phân tích để đánh giá hiệu quả thu nhận nhóm chất polyphenol. Thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do (DPPH) và khả năng khử sắt được tiến hành để khảo sát khả năng chống oxy hóa. TPC của các mẫu thí nghiệm dao động từ 20-30 mg axit gallic đương lượng/g chất khô (DW) và TFC đạt khoảng 10-14 mg quercetin đương lượng/g DW. Cao chiết từ dung môi ethanol 70% và methanol 70% có khả năng chống oxy hóa mạnh với nồng độ khử được 50% gốc DPPH (IC_{50}) lần lượt là 91,87 và 78,06 $\mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ 250-500 $\mu\text{g/ml}$, mẫu chiết bằng hai dung môi này cũng đạt được kết quả cao hơn mẫu chiết bằng nước nóng trong thử nghiệm năng lực khử. Kết quả cho thấy, chiết xuất lá ổi chứa nhiều chất chống oxy hóa có thể ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm/dược phẩm.

Từ khóa: dịch chiết, dung môi, flavonoid, hoạt tính chống oxy hóa, lá ổi, polyphenol.

Chỉ số phân loại: 2.4, 3.5

Effect of selected solvents on the efficient recovery of polyphenols and the antioxidant activity of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extracts

Thanh Ninh Le, Thi Tinh Nguyen, Thi Thu Huyen Bui, Nhu Quynh Do, Dai Lam Vi, Tien Dung Nguyen*

Faculty of Biotechnology and Food Technology, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, Quyet Thang Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 28 February 2023; revised 27 March 2023; accepted 30 March 2023

Abstract:

Guava leaves (*Psidium guajava* L.) have been documented as a rich source of phytochemicals with potential health benefits. This study aimed to investigate the effects of selected solvents on the polyphenols content and the antioxidant activity of guava leaf (*Psidium guajava* L.) extracts. Ethanol 70%, methanol 70%, and hot water are selected solvents. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) were determined to evaluate the efficient recovery of polyphenols. The DPPH radical scavenging ability and reducing power assays were performed to assess antioxidant activity. The TPC of tested samples was analysed to be 20-30 mg gallic acid equivalent/g dry weight (DW), and the TFC reached around 10-14 mg quercetin equivalent/g DW. Samples extracted by ethanol 70% and methanol 70% exhibited strong DPPH radical scavenging capacity with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 91.87 and 78.06 $\mu\text{g/ml}$. At a concentration of 250-500 $\mu\text{g/ml}$, samples extracted by these two solvents showed higher values than those extracted with hot water in the reducing power test. The results showed that the guava leaf extract is suggested as a potential source of natural antioxidants for applications in the functional food/pharmaceutical industry.

Keywords: antioxidant activity, extract, flavonoid, guava leaves, polyphenol, solvent.

Classification numbers: 2.4, 3.5

*Tác giả liên hệ: Email: dungnt@tuaf.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Thực vật là nguồn cung cấp chính các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học. Việc phát hiện và ứng dụng các hợp chất này trong hỗ trợ điều trị bệnh và tăng cường sức khỏe, đã trở thành một hướng nghiên cứu tiềm năng được quan tâm và đầu tư trong vài thập kỷ qua [1]. Ngoài ra, một số phương pháp tiếp cận hiện đại đang được thực hiện để khám phá các hợp chất hoạt tính sinh học mới. Nhiều công bố quốc tế đã chỉ ra rằng những chất chuyển hóa thứ cấp này có tác dụng ngăn ngừa sự phát triển của các bệnh như tim mạch, tiểu đường, huyết áp, béo phì, viêm nhiễm, lão hóa sớm và một số loại ung thư [2]. Hiện nay, các ngành công nghiệp mỹ phẩm, dược phẩm và dinh dưỡng đang tập trung phát triển các sản phẩm từ thực vật. Dự kiến tăng trưởng của thị trường chế phẩm thực vật toàn cầu đạt khoảng 86,74 tỷ USD vào năm 2022, với thị phần lớn nhất thuộc về lĩnh vực dược phẩm, tiếp theo là ngành công nghiệp thực phẩm chức năng [3].

Cây ổi (*Psidium guajava* L.), thuộc họ Myrtaceae, là loại cây ăn quả thuộc khí hậu nhiệt đới, được trồng rộng rãi tại Việt Nam vì hương vị và thành phần hoạt chất phong phú. Ở khía cạnh dược liệu, tất cả các bộ phận của cây ổi, bao gồm quả và các phụ phẩm như búp non, lá, vỏ thân và vỏ rễ, đều đã được y học dân gian sử dụng từ rất lâu như một vị thuốc để điều trị một số loại bệnh khác nhau như viêm ruột, tiêu chảy, tiểu đường... [4].

Trong số tất cả các bộ phận của thực vật này, lá cây đã được chứng minh là nơi tích tụ đa dạng nhất các hợp chất có hoạt tính sinh học. Vì vậy, mặc dù phần lá thường được coi là một trong những nguồn chất thải nông nghiệp chính, chúng cũng được đánh giá là một nguồn phong phú các hợp chất tự nhiên có giá trị ứng dụng trong những năm gần đây [1]. Một số báo cáo học thuật đã chỉ ra rằng thành phần hợp chất của lá ổi rất đa dạng, bao gồm flavonoid, carotenoid, axit phenolic, triterpenoid, saponin và lectin. Những nghiên cứu này cũng sử dụng các mô hình *in vitro* và *in vivo* để đánh giá các hoạt tính sinh học của chiết xuất lá ổi liên quan đến tác dụng hỗ trợ và tăng cường sức khỏe, đặc biệt là khả năng kháng khuẩn và kháng bệnh đại tháo đường. Một số nghiên cứu đã xác định vai trò chất chiết lá ổi như tác nhân ức chế khối u và gây độc mạnh đối với một số dòng tế bào ung thư [1, 4, 5].

Mặt khác, những nghiên cứu tách chiết các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học từ các phụ phẩm nông nghiệp để ứng dụng trong việc phát triển và sản xuất sản phẩm thực phẩm chức năng/dược phẩm mới là rất cần thiết [6]. Trong chương trình nghiên cứu và đổi mới Horizon 2020 được tài trợ bởi Liên minh châu Âu, các dự án về ứng dụng phụ phẩm nông nghiệp đã được khuyến khích với mục đích thu nhận các hợp chất tự nhiên, sau đó kết hợp vào các công thức phối trộn để phát triển sản phẩm thực tiễn từ nguồn phụ phẩm nông nghiệp [7]. Điều này sẽ góp phần hạn chế tác hại của rác thải nông nghiệp đến môi trường, giảm thiểu chi phí cho việc xử lý và đồng thời mở ra hướng ứng dụng có tính bền vững và thực tiễn [8].

Dựa vào những luận điểm đã nêu ở trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn và đánh giá sự ảnh hưởng của một số dung môi đến hiệu quả thu nhận hoạt chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá ổi. Với cơ sở lý luận là hiệu quả tách chiết các hợp chất tự nhiên liên quan đến nhiều yếu tố, đặc biệt là sự tương tác giữa cấu trúc hóa học của hợp chất với độ phân cực của dung môi được sử dụng, báo cáo này muốn đưa ra thêm kết quả nghiên cứu khoa học để đề xuất khả năng ứng dụng và phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng và dược phẩm từ lá ổi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lá ổi được lựa chọn từ cây ổi 4 năm tuổi, thuộc giống ổi Đông Du, trồng tại mô hình nhà lưới tại Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên. Mẫu lá tươi, xanh và tăng trưởng tốt được thu hái từ các cây ổi khác nhau cho mỗi lần lặp lại.

Các mẫu lá ổi được ngâm trong dung dịch NaHCO₃ 10% trong 15 phút, rửa sạch và sấy khô ở 40°C, sau đó được xay thành bột và bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Thu nhận dịch chiết thô và đánh giá hiệu quả tách chiết

Đầu tiên, mẫu được chiết xuất trong các dung môi khác nhau bao gồm nước nóng, ethanol 70% và methanol 70%. Một số nghiên cứu trước đây đã so sánh ảnh hưởng của các loại dung môi hữu cơ khác nhau (ethanol, metanol và axeton) ở nồng độ (0-90%) đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của một số mẫu thực vật khác [9-11]. Dựa trên kết quả của họ, ba loại dung môi đã được lựa chọn cho nghiên cứu của chúng tôi bởi hiệu quả trích ly tốt, an toàn và phù hợp với thí nghiệm về thực phẩm và dược liệu. 10 g mẫu chất khô lá ổi (DW) được ngâm và lắc trong 100 ml dung môi ethanol 70% và methanol 70% trong 48 tiếng ở 30°C, và 100 ml nước cất ở 80°C trong 30 phút sử dụng bể ổn nhiệt WNB22 (Memmert GmbH, Schwabach, Đức). Sau đó, dịch chiết được lọc bằng giấy lọc hai đến ba lần cho đến khi loại bỏ hết cặn và bảo quản ở 4°C.

Để tiến hành đánh giá hiệu suất tách chiết và khả năng chống oxy hóa, dịch chiết được thu nhận bằng phương pháp tương tự như trên, sau đó được cô quay ở 40°C và áp suất chân không 100 mBar, và sấy thành cao thô ở 40°C bằng thiết bị cô quay RV8 (IKA Works, Quảng Châu, Trung Quốc) và tủ sấy TR 120 (Nabertherm GmbH, Lilienthal, Đức). Hiệu suất tách chiết được tính bằng công thức: Hiệu suất tách chiết (%) = [Trọng lượng cao chiết thô thu được (g)/trọng lượng mẫu khô sử dụng (g)] × 100%.

2.3. Phương pháp định tính hợp chất phenolic, flavonoid và triterpenoid

Các hợp chất thuộc nhóm polyphenol được định tính bằng phương pháp pha loãng 1 ml dịch chiết với 8 ml nước khử ion, thêm vào 5-10 giọt dung dịch FeCl₃ 2% và quan sát hiện tượng. Các hợp chất thuộc phân nhóm flavonoid được định tính bằng phương pháp pha loãng 1 ml dịch chiết với 8 ml nước cất, thêm vào 1 ml NaOH 10% và quan sát hiện tượng. Các hợp chất thuộc phân nhóm triterpenoid được định tính bằng phương pháp pha loãng 1 ml dịch chiết với 5 ml ethanol 95%, thêm vào 2 ml acetic anhydride 99% và 2 ml H₂SO₄ 95%, sau đó quan sát hiện tượng [12, 13].

2.4. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic toàn phần

Lấy 0,1 ml dịch chiết lá ổi nồng độ 0,1 g DW/ml trộn với 1 ml nước cất trong ống nghiệm, sau đó thêm vào 0,2 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Hỗn hợp được trộn đều và ủ tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng. Sau 5 phút, thêm vào 1,5 ml dung dịch Na₂CO₃ 7,5%. Hỗn hợp được trộn và tiếp tục ủ tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng trong 90 phút trước khi đo ở bước sóng 765 nm trên máy quang phổ kế (721G, Measuretech, Thượng Hải, Trung Quốc). Hàm lượng TPC được tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn axit gallic và được biểu thị bằng giá trị axit gallic đương lượng (GAE) mg/g DW [14].

2.5. Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Lấy 0,25 ml dịch chiết lá ôi nồng độ 0,1 g DW/ml trộn với 0,075 ml dung dịch NaNO₂ 5%, 0,15 ml dung dịch AlCl₃ 10% và 0,5 ml dung dịch NaOH 1 M trong ống nghiệm. Sau đó, hỗn hợp được thêm nước cất để điều chỉnh đến thể tích 2,5 ml, trộn đều và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng trước khi đo ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng flavonoid toàn phần(TFC) được tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn catechin và được biểu thị bằng giá trị catechin đương lượng (CE) mg/g DW [14].

2.6. Phương pháp xác định hàm lượng triterpenoid toàn phần

Lấy 0,08 ml dịch chiết lá ôi nồng độ 0,1 g DW/ml trộn với 0,12 ml dung dịch axit axetic-vanilin 5% trong ống nghiệm và được ủ trong 10 phút ở 90°C. Sau đó, 0,4 ml axit H₂SO₄ 95% được thêm vào, trộn đều và ủ trong 45 phút ở 60°C. Hỗn hợp này được đặt trong đá để làm lạnh và tiếp tục thêm vào 1,8 ml axit axetic lạnh trước khi đo ở bước sóng 550 nm. Hàm lượng triterpenoid toàn phần (TTC) được tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn axit ursolic và được biểu thị bằng giá trị axit ursolic đương lượng (UAE) mg/g DW [15].

2.7. Phương pháp đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH

Lấy cao chiết lá ôi hòa tan vào dung môi tương ứng ở các nồng độ từ 31,25-500 µg/ml để được mẫu thí nghiệm. Lấy vitamin C hòa tan vào nước cất ở cùng dải nồng độ để được đối chứng dương. Sau đó, lấy 5 ml mẫu trộn và 5 ml đối chứng dương trộn riêng biệt với 1 ml dung dịch DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 1 mM trong ống nghiệm. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong bóng tối 60 phút ở nhiệt độ phòng trước khi đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH (%) được xác định theo công thức sau: $[1 - (A \text{ mẫu} - A \text{ mẫu trắng})/A \text{ đối chứng}] \times 100\%$. Trong đó, A mẫu là độ hấp thụ quang học (giá trị OD) của mẫu cao chiết phản ứng với dung dịch DPPH, A mẫu trắng là giá trị OD của mẫu cao chiết hòa với methanol và A đối chứng là giá trị OD của dung dịch DPPH hòa với methanol. Giá trị IC₅₀ là nồng độ tối thiểu của cao chiết trung hòa được 50 % gốc tự do DPPH và được tính toán dựa vào mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ mẫu và phần trăm DPPH bị trung hòa [14].

2.8. Phương pháp đánh giá năng lực khử

Lấy cao chiết lá ôi hòa tan vào dung môi tương ứng ở các nồng độ từ 31,25-500 µg/ml để được mẫu thí nghiệm. Lấy vitamin C hòa tan vào nước cất ở cùng dải nồng độ để được đối chứng dương. Sau đó, lấy 2,5 ml mẫu và 2,5 ml đối chứng dương trộn riêng biệt với 5 ml dung dịch PBS 0,2 M (pH 6,6) và 2,5 ml dung dịch K₃Fe(CN)₆, 1% trong ống nghiệm. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong 20 phút ở 50°C, sau đó 2,5 ml dung dịch axit trichloroacetic 10% được thêm vào. Hỗn hợp được trộn đều và ly tâm trong 10 phút (3000 vòng/phút). Cuối cùng, 2,5 ml phần dịch trên tủa được tách ra và trộn với 2,5 ml nước cất và 0,5 ml dung dịch FeCl₃, 0,1%. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong 10 phút nhiệt độ phòng trước khi đo ở bước sóng 700 nm. Giá trị EC₅₀ là nồng độ cao chiết có năng lực khử sắt với giá trị OD₇₀₀ đạt 0,5 được tính toán dựa vào mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ mẫu và giá trị OD [14].

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu được trong các thí nghiệm sau ba lần lặp lại được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu (p≤0,05) và hệ số tương quan được phân tích bằng phương pháp thống kê ANOVA, sử dụng phần mềm SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Mỹ).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả định tính các hợp chất phenolic, flavonoid và triterpenoid

Polyphenol là một nhóm các hợp chất phenolic được tổng hợp từ thực vật, hoạt động như chất chống oxy hóa mạnh và đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa các bệnh liên quan đến não, ung thư, viêm, tiểu đường và tim mạch. Tùy thuộc vào độ bền của vòng phenol, polyphenol được phân loại thành nhiều phân nhóm, nhưng có hai phân nhóm phổ biến nhất là axit phenolic và flavonoid. Triterpenoid (hay còn được gọi là triterpenoid saponin) là một trong hai phân nhóm chính của nhóm các hợp chất saponin. Các hợp chất này được báo cáo có tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm, kháng virus, kháng khuẩn, chống Alzheimer và ức chế enzyme α-glucosidase. Kết quả cho thấy rằng trong dịch chiết từ các dung môi đã sử dụng đều có sự hiện diện của các hợp chất thuộc nhóm polyphenol, phân nhóm flavonoid và phân nhóm triterpenoid saponin (bảng 1). Kết quả này hoàn toàn tương thích với một số nghiên cứu trước đây, và những nghiên cứu này cũng thực hiện định tính một số nhóm hợp chất tự nhiên khác trong mẫu lá ôi như alkaloids, steroids và tannin [12-14, 16].

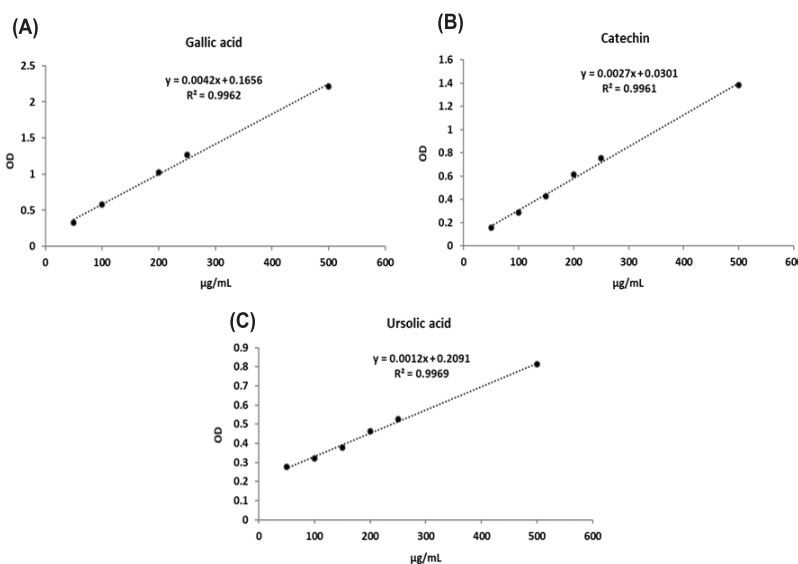
Bảng 1. Kết quả định tính hợp chất phenolic, flavonoid và triterpenoid.

Hợp chất	Hiện tượng	Kết quả phản ứng		
		Ethanol 70%	Methanol 70%	Nước nóng
Phenolic	Chuyển màu xanh đen	+	+	+
Flavonoid	Chuyển màu vàng đậm	+	+	+
Triterpenoid	Chuyển màu nâu đậm	+	+	+

+ : có sự hiện diện của hợp chất ở trong mẫu thí nghiệm.

3.2. Hàm lượng phenolic, flavonoid và triterpenoid toàn phần

Để đánh giá sự ảnh hưởng của hệ dung môi đến hiệu quả thu hồi các hợp chất phenolic, flavonoid và triterpenoid của mẫu lá ôi, TPC, TFC và TTC đã được phân tích và tính toán sử dụng đường chuẩn axit gallic (hình 1A), catechin (hình 1B) và axit ursolic (hình 1C) trong dải nồng độ từ 50-500 µg/ml. Kết quả của nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.



Hình 1. Đường chuẩn (A) axit gallic, (B) catechin và (C) axit ursolic.

TPC trong dịch chiết lá ôi dao động từ khoảng 5,95±0,36 đến khoảng 8,80±0,45 mg GAE/g DW, khi chiết bằng nước nóng hoặc dung môi ethanol 70%. Kết quả phân tích thống kê cho thấy dịch chiết bằng nước nóng cho hàm lượng TPC thấp hơn so với chiết bằng ethanol 70% hay methanol 70%. Trong khi đó hàm lượng TPC tổng không có sự khác biệt có ý nghĩa khi chiết bằng ethanol 70% và methanol 70%. Ở những nghiên cứu trước đây, TPC đạt được trong khoảng dao động rất lớn từ khoảng 1,5-180 mg GAE/g trọng lượng mẫu khô lá ôi [12-14, 16-18]. Trong đó, nghiên cứu của J. Seo và cs (2014) cũng so sánh ảnh hưởng của một số loại dung môi (nước, ethanol và methanol ở các nồng độ 30-90%) đến hàm lượng các chất chống oxy hóa trong lá ôi được trồng ở phía Nam Gyeongsang, Hàn Quốc. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng, mẫu được chiết từ ethanol 50% đã đạt được những giá trị rất cao (khoảng 180 mg GAE/g), cao hơn mẫu được chiết từ các dung môi khác trong cùng nghiên cứu và cả những báo cáo trước đây về lá ôi [14].

Bảng 2. Hàm lượng phenolic, flavonoid và triterpenoid toàn phần.

Cao chiết	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg CE/g DW)	TTC (mg UAE/g DW)
Ethanol 70%	8,48±0,47 ^a	4,36±0,09 ^a	11,02±0,42 ^a
Methanol 70%	8,80±0,45 ^a	4,58±0,12 ^a	10,72±0,18 ^a
Nước nóng	5,95±0,36 ^b	3,31±0,33 ^b	7,05±0,63 ^b

Chữ cái ^{a, b} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong cùng cột ở p≤0,05.

Ở bảng 2, TFC khi chiết bằng dung môi nước nóng, 70% ethanol và 70% methanol đạt lần lượt 3,31±0,33, 4,36±0,09 và 4,36±0,09 mg CE/g DW. Tương tự như kết quả đánh giá hàm lượng phenolic tổng, hàm lượng flavonoid khi chiết xuất bằng methanol 70% cao hơn đáng kể so với ethanol 70%, và giá trị này thấp nhất khi chiết xuất bằng nước nóng. So sánh với kết quả TFC của lá ôi trong một số báo cáo trước đây (khoảng 1,0-60 mg QE (quercetin đương lượng)/g DW), mẫu lá ôi của nghiên cứu này đã đạt những giá trị TFC thấp hơn [12, 14, 16-18]. Tương tự với TPC, các giá trị TFC được báo cáo trong nghiên cứu của J. Seo và cs (2014) [14] cũng rất cao. Mẫu chiết từ nước nóng đạt giá trị TFC cao nhất (khoảng 50 mg QE/g) khi so sánh với các loại dung môi khác.

Tương tự như các thí nghiệm xác định hàm lượng phenolic và flavonoid toàn phần, kết quả xác định hàm lượng triterpenoid toàn phần trong nghiên cứu này cũng cho thấy mẫu dịch chiết ethanol 70% đạt giá trị TTC (11,02±0,42 mg UAE/mg DW) tương đương với mẫu dịch chiết methanol 70% (10,72±0,18 mg UAE/mg DW) và cao hơn đáng kể so với mẫu được tách chiết bằng nước nóng (7,05±0,63 UAE/mg DW) (bảng 2). Nghiên cứu của I.C. Chao và cs (2020) đã so sánh TTC của các mẫu quả và lá ôi được thu thập từ 15 vùng địa lý khác nhau của Trung Quốc và báo cáo rằng giá trị TTC của các mẫu này có sự khác biệt lớn (12,49-38,66 mg/g DW), và đồng thời đã xác định 9 hợp chất triterpenoid có trong các mẫu này [15]. Trong khi đó, J. Qin và cs (2023) [19] đã thu thập 18 mẫu lá của các giống (genotype) khác nhau ở Trung Quốc và cũng chỉ ra rằng giá trị TTC của các mẫu này đạt những sự khác biệt lớn (57,32-167,56 mg/g DW).

Nhìn chung, giá trị TPC, TFC và TTC của mẫu chất khô lá ôi thu được của nghiên cứu này thấp hơn so với một số báo cáo trước đây có thể do sự khác biệt về phương pháp chiết tách, về độ hòa tan hợp chất phenolic trong các dung môi, và về thành phần hợp chất của các mẫu khác nhau do được trồng và chăm sóc ở những điều kiện khác nhau [14,

18, 20]. Ngoài ra, sự chênh lệch này cũng có thể do tỷ lệ nguyên liệu/dung môi sử dụng trong nghiên cứu này (1/10) chưa đủ để hòa tan, trích ly hoàn toàn các hợp chất polyphenol ra khỏi nguyên liệu, mặc dù tỷ lệ 1/5 đến 1/10 đã được chứng minh là thích hợp để tách chiết các hợp chất tự nhiên từ thực vật trong một số nghiên cứu trước đây [21, 22]. Mặt khác, một số nghiên cứu đã khảo sát các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi cao hơn (khoảng 1/10 đến 1/40) và chỉ ra rằng hàm lượng các hợp chất tự nhiên thu được tăng dần khi tăng lượng dung môi. Tuy nhiên, khi tăng đến một lượng dung môi nhất định sẽ dẫn đến sự cân bằng giữa các pha đo hàm lượng các hợp chất này trong mẫu là cố định, làm hiệu quả trích ly không tăng thêm nữa [23, 24].

Kết quả thu nhận TPC, TFC và TTC trong nghiên cứu này đều chỉ ra rằng dung môi methanol 70% và ethanol 70% có hiệu quả tách chiết tốt hơn và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nước nóng, mặc dù nước có độ phân cực cao. Điều này có thể giải thích bởi các hợp chất polyphenol trong lá ôi có chứa nhiều nhóm hydroxyl linh động, nhưng vì có cấu trúc phân tử lớn nên có thể độ phân cực của chúng tương đương với độ phân cực của methanol và ethanol ở nồng độ 70%, nên đã hòa tan tốt hơn. Hiệu quả tách chiết hợp chất từ thực vật phụ thuộc vào đặc tính của nguyên liệu, phương pháp và loại dung môi sử dụng, đặc biệt liên quan đến độ phân cực của dung môi. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng những dung môi có độ phân cực cao như nước (1,000), methanol (0,762) và ethanol (0,654) là dung môi lý tưởng để chiết xuất các hợp chất tự nhiên từ thực vật, đặc biệt là nhóm polyphenol [11, 20, 25]. Tuy nhiên, các mẫu thực vật khác nhau có chứa các hợp chất phenolic với các cấu trúc, giá trị liên kết hydro và độ phân cực rất đa dạng. Do đó, sự tương tác giữa các hợp chất phenolic với những dung môi kể trên, và cả hệ dung môi được kết hợp từ những dung môi này ở những tỷ lệ khác nhau, sẽ dẫn đến khả năng chiết không giống nhau. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng khi kết hợp ethanol, methanol hoặc acetone với nước theo các tỷ lệ khác nhau (30-70%) sẽ tạo ra các hỗn hợp dung môi có hiệu quả tách chiết cao hơn [9-11, 26, 27].

3.3. Hiệu suất thu hồi cao chiết

Thí nghiệm đánh giá sự ảnh hưởng của ba loại dung môi ethanol 70%, methanol 70% và nước nóng đến hiệu quả thu nhận cao chiết thô từ mẫu chất khô lá ôi đã được thực hiện. Kết quả cho thấy khối lượng cao chiết thu được thấp nhất là 1,15 g tương ứng với hiệu suất là 11,5% đối với dịch chiết nước nóng. Hiệu suất đạt cao hơn khi được chiết bằng dung môi ethanol 70% và methanol 70% với hiệu suất chiết tương ứng là 18,3% và 20,2%, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hiệu suất thu hồi cao chiết của hai dung môi này (bảng 3). Như vậy, có thể thấy rằng, ảnh hưởng của ba loại dung môi được sử dụng tới hiệu suất thu hồi cao chiết thô cũng tương đồng với hàm lượng tổng polyphenol phân tích được. Kết quả này cao hơn chỉ số tối thiểu là 8,5% tính theo dược liệu khô (theo quy định của Dược điển Việt Nam IV). Tương đồng với kết quả của nghiên cứu này, một số nghiên cứu trước đây về so sánh ảnh hưởng của các loại dung môi tới hiệu quả thu nhận cao chiết từ thực vật cũng chỉ ra rằng một số dung môi hữu cơ như ethanol và methanol đều cho kết quả tốt hơn so với phương pháp chiết bằng nước, mặc dù độ phân cực của nước cao hơn những dung môi này [11, 26, 28]. Nghiên cứu của Q.D. Do và cs (2014) [26] chỉ ra rằng hiệu suất thu hồi cao chiết từ lá Ngõ (*Limnophila aromatica*) đã đạt được những giá trị rất cao (trên 30%) khi được chiết bằng dung môi ethanol, methanol và acetone, và

đạt giá trị thấp hơn (xấp xỉ 25%) khi được chiết bằng nước cất. Mặt khác, nghiên cứu của N.H.M. Jusoh và cs (2019) [29] đã báo cáo rằng sử dụng nước cất ở điều kiện nhiệt độ phòng và ở 121°C đều cho hiệu suất tách chiết hoạt chất sinh học từ Diệp hạ châu (*Phyllanthus tenellus* Roxb) cao hơn khi được chiết bởi methanol [29].

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi cao chiết thô từ mẫu chất khô lá ôi.

Dịch chiết	Mẫu khô (g)	Dung môi (ml)	Cao chiết (g)	Hiệu suất (%)	Trạng thái	Màu sắc
Ethanol 70%	10	100	1,83	18,3	Sánh đặc	Xanh đen
Methanol 70%	10	100	2,02	20,2	Sánh đặc	Xanh đen
Nước nóng	10	100	1,15	11,5	Sánh đặc	Xanh đen

3.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết từ lá ôi được thể hiện thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Khi có mặt của chất chống oxy hóa, điện tử tự do của phân tử nitơ trong DDPH sẽ bắt cặp với gốc hydro từ chất chống oxy hóa, DPPH sẽ bị khử thành DPPH-H (2,2-Diphenyl-1- picrylhydrazine) và mất đi màu tím đặc trưng [30]. Kết quả thử nghiệm DPPH của dịch chiết lá ôi từ các dung môi khác nhau được trình bày ở bảng 4. Cao chiết từ dung môi ethanol 70% và methanol 70% thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do DPPH mạnh với các giá trị IC₅₀ thu được lần lượt là 91,87±2,56 và 78,06±7,37 µg/ml. Cao chiết từ nước khả năng bắt gốc tự do yếu hơn với giá trị IC₅₀ là 121,14±4,05 µg/ml. Đối chứng dương vitamin C thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH rất mạnh với giá trị IC₅₀ thấp hơn 31,25 µg/ml. Theo một số nghiên cứu trước đây, giá trị IC₅₀ thể hiện khả năng khử được 50% gốc tự do DPPH của cao chiết từ thực vật được chia thành năm nhóm: rất mạnh (<50 µg/ml); mạnh (51-100 µg/ml); trung bình (101-250 µg/ml); yếu (251-500 µg/ml); không có hoạt tính (>500 µg/ml) [31, 32].

Bảng 4. Khả năng bắt gốc tự do của cao chiết lá ôi.

Cao chiết	Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%) của mẫu (µg/ml)					IC ₅₀ (µg/ml)
	31,25	62,5	125	250	500	
Ethanol 70%	37,83±4,17 ^b	49,30±3,72 ^b	73,22±2,67 ^b	86,67±2,64 ^a	89,03±3,37 ^a	91,87±2,56 ^b
Methanol 70%	35,19±4,34 ^c	51,71±5,35 ^b	69,53±4,19 ^b	84,42±1,55 ^{ab}	91,28±3,60 ^a	78,06±7,37 ^b
Nước nóng	23,49±2,25 ^c	33,84±1,82 ^c	52,33±4,40 ^c	71,63±4,73 ^b	80,16±3,80 ^a	121,14±4,05 ^a
Vitamin C [*]	54,77±2,60 ^a	76,16±3,91 ^a	87,95±3,06 ^a	89,22±3,41 ^a	87,44±2,02 ^a	<31,25

Chữ cái ^{a, b, c} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong cùng cột ở p≤0,05.

Phép thử năng lực khử cũng được sử dụng để đánh giá khả năng chống oxy hóa của dịch chiết lá ôi trong nghiên cứu này. Chất chống oxy hóa có khả năng khử Fe³⁺ thành Fe²⁺, phức này tác dụng với FeCl₃ thành phức hợp KFe[Fe(CN)₆] màu xanh lam đậm. Cường độ màu xanh sau phản ứng tỉ lệ với hàm lượng chất chống oxy hóa. Giá trị OD thu được càng cao chứng tỏ năng lực khử của mẫu càng mạnh [30]. Kết quả thể hiện ở bảng 5 cho thấy rằng năng lực khử của cao chiết từ ethanol 70% và methanol 70% mạnh hơn so với cao chiết từ nước nóng với các giá trị OD tại bước sóng 700 nm lần lượt là 1,32±0,04, 1,33±0,06 và 1,18±0,07 ở nồng độ 250 µg/ml, và 1,89±0,07, 1,94±0,12 và 1,42±0,04 ở nồng độ 500 µg/ml, tương ứng với các giá trị EC₅₀ lần lượt là 53,74±5,44, 55,56±3,98 và 72,59±6,46 µg/ml. Giá trị OD các mẫu cao chiết đều thấp hơn nhiều so với giá trị OD của đối chứng dương các nồng độ từ 62,5-

500 µg/ml. Như vậy, tương đồng kết quả phân tích TPC, TFC và hiệu suất thu nhận cao chiết thô trong nghiên cứu này, và cũng tương đồng với kết quả được báo cáo ở một số nghiên cứu trước đây, mẫu chiết từ dung môi ethanol 70% và methanol 70% cũng thể hiện khả năng chống oxy hóa cao hơn so với mẫu chiết từ nước [9-11].

Bảng 5. Năng lực khử của cao chiết lá ôi.

Cao chiết	Năng lực khử (OD ₇₀₀) của mẫu (µg/ml)					EC ₅₀ (µg/ml)
	31,25	62,5	125	250	500	
Ethanol 70%	0,38±0,05 ^a	0,54±0,05 ^b	0,74±0,07 ^b	1,32±0,04 ^b	1,89±0,07 ^b	53,74±5,44 ^b
Methanol 70%	0,35±0,03 ^a	0,49±0,04 ^b	0,79±0,07 ^b	1,33±0,06 ^b	1,94±0,12 ^b	55,56±3,98 ^b
Nước nóng	0,22±0,04 ^a	0,40±0,02 ^b	0,53±0,05 ^b	1,18±0,07 ^b	1,42±0,04 ^c	72,59±6,46 ^a
Vitamin C	0,48±0,13 ^a	0,72±0,08 ^a	1,34±0,14 ^a	2,24±0,07 ^a	2,35±0,06 ^a	36,87±6,63 ^c

Chữ cái ^{a, b, c} thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong cùng cột ở p≤0,05.

Một số báo cáo trước đây đã thực hiện nhiều phương pháp khác nhau để chỉ ra rằng dịch chiết và cao chiết lá ôi có khả năng chống oxy hóa cao, bao gồm phép thử khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS; khả năng trung hòa gốc NO, NO₂, HO; khả năng trung hòa H₂O₂; khảo sát năng lực khử; phương pháp chuẩn độ pemanganat; và phương pháp xanh metylen [13, 14, 33]. A.E. Bedawey và cs (2010) [34] đã so sánh khả năng chống oxy hóa của một số phụ phẩm nông nghiệp, bao gồm rễ gừng, lá ôi, hạt ôi, vỏ hạt vừng, vỏ cam, cám gạo và mầm lúa mì, và chỉ ra rằng lá ôi có khả năng chống oxy hóa chỉ thấp hơn rễ gừng và cao hơn tất cả các mẫu thí nghiệm còn lại. Thêm vào đó, nghiên cứu gần đây của R.S. Farag và cs (2020) [12] báo cáo rằng kết quả thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết lá ôi tương đương với dịch chiết lá lựu, và cao hơn dịch chiết từ lá sung và lá ô liu.

Liên quan đến mục tiêu của nghiên cứu này, một số yếu tố khác ảnh hưởng hiệu quả thu nhận hợp chất polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của chiết xuất lá ôi như nhiệt độ sấy/trích ly, phương pháp tách chiết, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu... cũng cần khảo sát. Ngoài ra, một số phân tích các hợp chất khác của mẫu lá ôi như tanin và alkaloids, cũng như đánh giá một số hoạt tính sinh học khác như ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase gây bệnh tiểu đường hay ức chế enzyme chuyển đổi angiotensin gây bệnh cao huyết áp, kháng viêm, ức chế tế bào ung thư... cần được tiếp tục thực hiện.

3.5. Mối tương quan giữa phenolic tổng, flavonoid tổng, triterpenoid toàn phần và hoạt tính chống oxy hóa

Từ số liệu thí nghiệm, mối tương quan giữa TPC, TFC, TTC và hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu chiết xuất lá ôi được xác định bằng phép so sánh Pearson. Kết quả phân tích ở bảng 6 chỉ ra rằng TPC, TFC

Bảng 6. Hệ số tương quan giữa phenolic tổng, flavonoid tổng, triterpenoid toàn phần với khả năng chống oxy hóa.

Hệ số tương quan	TPC	TFC	TTC	DPPH IC ₅₀	Năng lực khử EC ₅₀
TPC	1	0,844**	0,997**	-0,966**	-0,880**
TFC		1	0,842**	-0,891**	-0,867**
TTC			1	-0,885**	-0,790*
DPPH IC ₅₀				1	0,877**
Năng lực khử EC ₅₀					1

*, **: giá trị tương quan có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,01 và 0,5 trong phép so sánh tương quan Pearson.

và TTC tương quan thuận ($r > 0$) có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,01. Điều này có nghĩa là hàm lượng có TPC, TFC và TTC của dịch chiết lá ôi có tỷ lệ thuận với nhau khi được tách chiết bằng các dung môi khác nhau. Ngược lại, các giá trị TPC, TFC và TTC thể hiện mối tương quan nghịch với các giá trị IC_{50} của thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH và thử nghiệm năng lực khử ($r < 0$) ở mức ý nghĩa 0,01. Điều này chứng tỏ rằng, hàm lượng các hợp chất này trong lá ôi tác động trực tiếp đến hoạt tính chống oxy hóa. Hàm lượng các hợp chất này có trong chiết xuất thu được càng cao, mẫu sẽ sẽ có khả năng chống oxy hóa càng mạnh.

4. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, ethanol 70%, methanol 70% và nước nóng đều có thể sử dụng làm dung môi để tách chiết các hợp chất polyphenol từ mẫu chất khô lá ôi, và dịch chiết từ các dung môi này đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa. Dung môi ethanol 70% và methanol 70% cho hiệu quả tách chiết tương đương nhau và cao hơn nước nóng. Dịch chiết bằng hai dung môi này cũng thể hiện khả năng chống oxy hóa cao hơn so với dịch chiết bằng nước nóng. Hoạt tính chống oxy hóa tỷ lệ thuận với hàm lượng TPC, TFC và TTC trong dịch chiết. Từ kết quả của nghiên cứu, có thể thấy rằng, dịch chiết từ lá ôi là một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên tiềm năng cho những nghiên cứu sản xuất sản phẩm thực phẩm chức năng và dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Kumar, M. Tomar, R. Amarowicz, et al. (2021), "Guava (*Psidium guajava* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities", *Foods*, **10**, pp.1-20, DOI: 10.3390/foods10040752.

[2] A. Ranjan, S. Ramachandran, N. Gupta, et al. (2019), "Role of phytochemicals in cancer prevention", *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, pp.1-17, DOI: 10.3390/ijms2020498.

[3] S. Rodino, M. Butu (2019), "Herbal extracts-new trends in functional and medicinal beverages", *Functional and Medicinal Beverages*, **2019**, pp.73-108, DOI: 10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0.

[4] S. Naseer, S. Hussain, N. Naeem, et al. (2018), "The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava)", *Clinical Phytoscience*, **4**, pp.1-8, DOI: 10.1186/s40816-018-0093-8.

[5] E.D.D. Cerio, V. Verardo, A.M.G. Caravaca, et al. (2017), "Health effects of *Psidium guajava* L. leaves: An overview of the last decade", *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, pp.1-31, DOI: 10.3390/ijms18040897.

[6] S.P. Moral, M.D.L.L.C. Gurra, C.R. Pérez, et al. (2020), "Recent advances in extraction technologies of phytochemicals applied for the revaluation of agri-food by-products", *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*, **2020**, pp.209-239, DOI: 10.1016/Sahidh-0-12-818593-3.00007-5.

[7] S.B. Othman, I. Jödu, R.J. Bhat (2020), "Bioactives from agri-food wastes: Present insights and future challenges", *Molecules*, **3**, pp.1-34, DOI: 10.3390/molecules25030510.

[8] T.N. Le, N. Sakulsatporn, C.H. Chiu, et al. (2020), "Polyphenolic profile and varied bioactivities of processed Taiwanese grown broccoli: A comparative study of edible and non-edible parts", *Pharmaceuticals*, **13**, pp.1-14, DOI: 10.3390/ph13050082.

[9] Y.L. Ma, P. Sun, J. Feng, et al. (2021), "Solvent effect on phenolics and antioxidant activity of Huangshan Gongju (*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvel. cv. Gongju) extract", *Food Chemical Toxicology*, **147**, DOI: 10.1016/j.fct.2020.111875.

[10] R. Nandasiri, N.M. Eskin, U.J.T. Höllander (2019), "Antioxidative polyphenols of canola meal extracted by high pressure: Impact of temperature and solvents", *Journal of Food Science*, **84**(11), pp.3117-3128, DOI: 10.1111/1750-3841.14799.

[11] S.A. Radzali, M. Markom, N.M.J. Saleh (2020), "Co-solvent selection for supercritical fluid extraction (SFE) of phenolic compounds from *Labisia pumila*", *Molecules*, **25**(24), DOI: 10.3390/molecules25245859.

[12] R.S. Farag, M.S.A. Latif, H.H.A.E. Baky, et al. (2020), "Phytochemical screening and antioxidant activity of some medicinal plants' crude juices", *Biotechnology Reports*, **28**, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00536.

[13] N.B. Gaber, S.I.E. Dahy, E.A.J. Shalaby (2021), "Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues", *Biomass Conversion and Biorefinery*, **13**, pp.4011-4020, DOI: 10.1007/S13399-021-01386-0.

[14] J. Seo, S. Lee, M.L. Elam, et al. (2014), "Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy", *Food Science and Nutrition*, **2**, pp.174-180, DOI: 10.1002/fsn3.91.

[15] I.C. Chao, Y. Chen, M.H. Gao, et al. (2020), "Simultaneous determination of α -glucosidase inhibitory triterpenoids in *Psidium guajava* using HPLC-DAD-ELSD and pressurized liquid extraction", *Molecules*, **25**, DOI: 10.3390/molecules25061278.

[16] E.D.D. Cerio, V. Verardo, A.M.G. Caravaca, et al. (2016), "Exploratory characterization of phenolic compounds with demonstrated anti-diabetic activity in guava leaves at different oxidation states", *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, DOI: 10.3390/ijms17050699.

[17] M. Jayachandran, R. Vinayagam, R.R. Ambati, et al. (2018), "Guava leaf extract diminishes hyperglycemia and oxidative stress, prevents β -cell death, inhibits inflammation, and regulates NF- κ B signaling pathway in STZ induced diabetic rats", *BioMed Research International*, pp.1-14, DOI: 10.1155/2018/4601649.

[18] Q.V. Nguyen, M.D. Doan, B.H.B. Thi, et al. (2022), "The effect of drying methods on chlorophyll, polyphenol, flavonoids, phenolic compounds contents, color and sensory properties, and in vitro antioxidant and anti-diabetic activities of dried wild guava leaves", *Drying Technology*, **41**(8), pp.1291-1302, DOI: 10.1080/07373937.2022.2145305.

[19] J. Qin, J. Wang, X. Shao, et al. (2023), "Evaluation of bioactive compounds, antioxidant capacity and mineral elements in the leaves of guava (*Psidium guajava* L.) genotypes from China", *Scientia Horticulturae*, **322**, DOI: 10.1016/j.scienta.2023.112436.

[20] E.H. Pool, A.L.R. Diaz, M.A.L. Jiménez, et al. (2021), "Effect of solvent polarity on the ultrasound assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS", *Ultrasonics Sonochemistry*, **76**, pp.1-12, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105658.

[21] J. Barauskaite, M. Marksa, L. Ivanauskas, et al. (2020), "Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. ssp. *santicha* (Hemp)", *Phytochemical Analysis*, **31**, pp.516-521, DOI: 10.1002/pca.2915.

[22] X.T. Le, V.L.L. Vi, T.Q. Toan, et al. (2019), "Extraction process of polyphenols from soybean (*Glycine max* L.) sprouts: Optimization and evaluation of antioxidant activity", *Processes*, **7**, DOI: 10.3390/pr7080489.

[23] P.A. Palsikowski, L.M. Besen, E.J. Klein, et al. (2020), "Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *B. forficata* subsp. *pruinosa*", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **98**, pp.2214-2226, DOI: 10.1002/cjce.23757.

[24] P. Suttiarporn, V.J. Choommongkol (2020), "Microwave-assisted improved extraction and purification of anticancer nimbolide from *Azadirachta indica* (Neem) leaves", *Molecules*, **25**, pp.1-15, DOI: 10.3390/molecules25122913.

[25] A. Borges, H. José, V. Homem, et al. (2020), "Comparison of techniques and solvents on the antimicrobial and antioxidant potential of extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*", *Antibiotics*, **9**, pp.1-18, DOI: 10.3390/antibiotics9020048.

[26] Q.D. Do, A.E. Angkawijaya, P.L.T. Nguyen, et al. (2014), "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*", *Journal of Food and Drug Analysis*, **22**, pp.296-302, DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.

[27] H.Y. Chen, Y.C. Lin, C.L.J. Hsieh (2007), "Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs", *Food Chemistry*, **104**(4), pp.1418-1424, DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.02.004.

[28] S.T. Ra, J. Sharath, M.J. Bhagya (2021), "Effect of extraction solvents on total phenol, flavonoid content and free radical scavenging potential of *Saraca asoca*, an Indian medicinal plant", *Journal of Applied Pharmacy*, **13**, pp.1-7.

[29] N.H.M. Jusoh, A. Subki, S.K. Yeap, et al. (2019), "Pressurized hot water extraction of hydrosable tannins from *Phyllanthus tenellus* Roxb.", **13**, pp.1-10, DOI: 10.1186/s13065-019-0653-0.

[30] I.G. Munteanu, C.J. Apetrei (2021), "Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review", *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, pp.1-20, DOI: 10.3390/ijms22073380.

[31] Z.N. Ilmi, P.A.C. Wulandari, S.A. Husen, et al. (2020), "Characterization of alginate from *Sargassum duplicatum* and the antioxidant effect of alginate-okra fruit extracts combination for wound healing on diabetic mice", *Applied Sciences*, **10**(17), DOI: 10.3390/app10176082.

[32] M. Jun, H.Y. Fu, J. Hong, et al. (2003), "Comparison of antioxidant activities of isoflavones from Kudzu root (*Pueraria lobata* Ohwi)", *Journal of Food Science*, **68**(6), pp.2117-2122, DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07029.x.

[33] Y. Luo, B. Peng, W. Wei, et al. (2019), "Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from guava leaves", *Molecules*, **24**, pp.1-14, DOI: 10.3390/molecules24071343.

[34] A.E. Bedawey, E. Mansour, M. Zaky, et al. (2010), "Characteristics of antioxidant isolated from some plant sources", *Food and Nutrition Sciences*, **1**, pp.1-12.