

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT VÀ KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA CỦA DỊCH CHIẾT TỪ THÂN CÂY XƯƠNG RỒNG BÀ CÓ GAI (*Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw.) MỘC Ở TỈNH PHÚ YÊN

Phan Quỳnh Trâm*, Huỳnh Thị Ngọc Ni

Trường Đại học Phú Yên

Ngày nhận bài: 04/12/2019; Ngày nhận đăng: 06/02/2020

Tóm tắt

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp chiết Soxhlet cho hiệu quả tách chiết các hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* cao hơn so với phương pháp ngâm tĩnh. Điều kiện thích hợp để tách chiết các hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp chiết Soxhlet như sau: dung môi ethanol 95%, tỷ lệ rắn/lỏng là 1/30, thời gian chiết 5 giờ, nhiệt độ chiết 78°C. Dịch chiết thu được trong điều kiện này có hàm lượng polyphenol tổng số và hàm lượng flavonoid tổng số khá cao với giá trị tương ứng là 143,14±1,71 mg GAE/g DW và 50,46±0,25 mg QE/DW. Đồng thời dịch chiết cũng thể hiện khả năng khử gốc tự do DDPH ở mức rất cao với giá trị IC₅₀ là 9,9 µg/ml so với mẫu đối chứng vitamin C - 14,02 µg/ml. Những kết quả trên cho thấy, dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai là một nguồn nguyên liệu tiềm năng để chiết xuất các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên và phát triển các loại thực phẩm chức năng hoặc các công thức thuốc sau này.

Từ khóa: xương rồng bà có gai, dịch chiết, polyphenol tổng số, flavonoid tổng số, hoạt tính chống oxy hóa

1. Đặt vấn đề

Cây xương rồng bà có gai (*Opuntia dillenii*) là một loài xương rồng thuộc chi *Opuntia* có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới châu Mỹ và hiện nay được phân bố rộng rãi ở vùng nhiệt đới châu Á, đặc biệt là vùng ven biển ở Thái Lan, Campuchia, Malaysia, Việt Nam và một số đảo ở Thái Bình Dương. Ở Việt Nam, xương rồng bà có gai lúc đầu là cây trồng, sau trở nên hoang dại hóa ở các truông gai, bãi cát ven biển các tỉnh ven biển miền Trung, Tây Nguyên và một số đảo lớn như Lý Sơn, Côn Đảo, Phú Quốc, Thực tế cho thấy, các tỉnh ven biển miền Trung Việt Nam, trong đó có Phú Yên, diện tích xương rồng bà có gai mọc tự nhiên khá lớn bởi có diện tích đất cát rộng. Tuy nhiên, tiềm năng của loài cây này vẫn chưa được khai thác và tận dụng đúng mức, hầu như nó chỉ được sử dụng để làm hàng rào, thức ăn gia súc hoặc phân bón cho cây trồng sau khi đã được đốt.

Trong y học dân gian, xương rồng bà có gai được dùng nhiều trong các bài thuốc chữa các loại bệnh như viêm loét dạ dày - tá tràng, trĩ ra máu, ho có đờm, viêm họng, phỏng, đái tháo đường, ... Đồng thời, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy, xương rồng bà có gai là nguồn lợi giàu polyphenol, flavonoid,... có hoạt tính sinh học như chất chống oxy hóa, kháng khuẩn với khả năng ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau như y học, thực phẩm [1-5].

* Email: quynhtram221@gmail.com

Tuy nhiên, ở Việt Nam chỉ mới bước đầu tập trung nghiên cứu về các hoạt tính sinh học của một số nhóm chất chính từ cây Nopal (*Opuntia spp.*). Năm 2013, Lương Huỳnh Ngọc Diễm, sinh viên Trường Đại học Kỹ Thuật Công Nghệ TP. Hồ Chí Minh đã nghiên cứu quy trình chiết tách pectin từ lá xương rồng bàn chải (*O. dillenii*) và khảo sát khả năng ứng dụng dịch chiết từ lá xương rồng này làm màng bảo quản trái cây [6]. Năm 2017, sinh viên Bùi Thị Thu Hằng, Trường Đại học Nha Trang đã thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ “Nghiên cứu thu nhận, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của pectin từ cây xương rồng bàn chải (*O. dillenii*) tại tỉnh Ninh Thuận” [19]. Gần đây đã có công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học hạ đường huyết và hạ cholesterol máu của một số nhóm hoạt chất chính từ cây Nopal (*Opuntia spp.*) được nhập vào Việt Nam của Tạ Thu Hằng (2017), Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội [7]. Như vậy, các nghiên cứu về hợp chất chống oxy hóa và khả năng chống oxy hóa của các loài xương rồng thuộc chi *Opuntia* trong đó có loài *Opuntia dillenii* ở nước ta còn rất hạn chế, đặc biệt là chưa có những nghiên cứu đi sâu vào khảo sát điều kiện tách chiết và xác định hoạt tính chống oxy hóa của loài cây này.

Trong khi đó, kết quả các nghiên cứu trên thế giới cho thấy hàm lượng các hợp chất chống oxy hóa và hoạt tính chống oxy hóa của các loài xương rồng thuộc chi *Opuntia* khá cao [2, 5, 13-18, 20-23]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào loài *Opuntia ficus-indica*, trong khi đó có rất ít thông tin khoa học và công trình nghiên cứu về hoạt tính chống oxy hóa của các loài xương rồng khác, đặc biệt có rất hiếm tài liệu nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa của loài *Opuntia dillenii*. Mặc khác, trong đa số các nghiên cứu, khả năng chống oxy hóa của các loài xương rồng thuộc chi *Opuntia* chỉ được xác định khi sử dụng một phương pháp tách chiết và một số dung môi chiết nhất định.

Vì thế nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định điều kiện tách chiết thích hợp và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai (*Opuntia dillenii*) mọc ở tỉnh Phú Yên, tạo ra dịch chiết có thể sử dụng trực tiếp hoặc tạo tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai vào thử nghiệm sản xuất các sản phẩm thực phẩm chức năng. Điều này không những góp phần làm đa dạng hóa các sản phẩm thực phẩm chức năng trên thị trường từ thân cây xương rồng bà có gai mà còn nâng cao giá trị của chúng đối với sức khỏe con người, đồng thời tận dụng được nguồn nguyên liệu thực phẩm chức năng từ thiên nhiên ưu đãi có trong cây xương rồng bà có gai ở Phú Yên.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là thân cây xương rồng được thu hái ở huyện Đông Hòa, tỉnh Phú Yên. Loài xương rồng này có tên khoa học chính xác là *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw., họ Cactaceae. Kết quả này đã được giám định bởi ThS. Đỗ Văn Hải – Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Ở Việt Nam loài này còn có tên xương rồng vọt gai, xương rồng bà có gai hay tiên nhân chuông.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý nguyên liệu

Thân cây xương rồng bà có gai ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau từ dạng tươi được sấy ở nhiệt độ 45⁰C đến độ ẩm không đổi. Nguyên liệu khô được nghiền nhỏ và sàng

qua lưới sàng có đường kính 0,1 mm. Bột thân cây xương rồng được bảo quản trong túi nilon tránh hút ẩm hoặc chứa trong lọ thủy tinh kín ở nhiệt độ phòng và được sử dụng để tách chiết, phân tích hàm lượng các hợp chất chống oxy hóa và xác định hoạt tính chống oxy hóa.

2.2.2. Phương pháp xác định độ ẩm nguyên liệu

Độ ẩm của nguyên liệu được xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ 105°C đến trọng lượng không đổi.

2.2.3. Phương pháp tách chiết và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết

Nghiên cứu thực hiện 2 phương pháp tách chiết sau: ngâm tĩnh và chiết Soxhlet.

2.2.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết bằng phương pháp ngâm tĩnh

Để nghiên cứu ảnh hưởng của loại dung môi chiết, 4 loại dung môi khác nhau được sử dụng bao gồm: n-hexan, ethyl acetat, ethanol và nước cất. Các thông số khác về thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được giữ cố định với giá trị tương ứng là: 120 phút, 50°C và 1/10 g/ml. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của thân cây xương rồng bà có gai được nghiên cứu ở các mức 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% và 99,5%. Các thông số khác được giữ cố định bao gồm: dung môi chiết thích hợp được lựa chọn từ thí nghiệm trước, nhiệt độ chiết 50°C, thời gian chiết 120 phút, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 g/ml.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được nghiên cứu ở các mức 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10, 1/11 và 1/12 g/ml. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại và nồng độ dung môi chiết thích hợp được lựa chọn từ các thí nghiệm trước, nhiệt độ chiết 50°C, thời gian chiết 120 phút.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai được thực hiện ở 40, 50, 60, 70 và 80°C. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp được chọn từ các thí nghiệm trước, thời gian chiết 120 phút.

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai được nghiên cứu ở các mức 30, 60, 90, 120, 150 và 180 phút. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi và nhiệt độ chiết thích hợp được lựa chọn từ thí nghiệm trước.

2.2.3.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết bằng phương pháp chiết Soxhlet

Hai yếu tố được khảo sát bao gồm: thời gian chiết và tỉ lệ rắn/lỏng. Ảnh hưởng của tỷ lệ rắn/lỏng được nghiên cứu ở các mức 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35 và 1/40 g/ml. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết được lựa chọn từ các thí nghiệm trước khi chiết bằng phương pháp ngâm tĩnh, nhiệt độ chiết gần với nhiệt độ sôi của ethanol 78°C và thời gian chiết là 180 phút.

Ảnh hưởng của thời gian chiết Soxhlet đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai được nghiên cứu ở các mức từ 120 đến 360 phút với bước nhảy là 30 phút. Các thông số được giữ cố định bao gồm: loại dung môi, nồng độ dung môi chiết được lựa chọn từ các thí nghiệm trước khi chiết bằng phương pháp ngâm tĩnh, tỉ lệ rắn/lỏng – được lựa chọn từ thí nghiệm trước và nhiệt độ chiết 78°C.

Đối với tất cả quá trình chiết ở trên, 10g nguyên liệu khô được sử dụng cho mỗi lần chiết. Mẫu sau khi chiết được làm lạnh đến nhiệt độ phòng, lọc, quay ly tâm với vận tốc 4000 vòng/phút trong vòng 15 phút, sau đó tiến hành cô quay đuôi dung môi, thu được dịch chiết cô đặc. Dịch chiết cô đặc được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa. Số liệu về hoạt tính chống oxy hóa được tính dựa trên hàm lượng chất khô của dịch chiết.

2.2.4. Phương pháp định tính một số hợp chất tự nhiên trong dịch chiết

Phương pháp định tính được thực hiện theo mô tả của Sofowora *et al.* và Tiwari *et al.* [8, 9]. Dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai được định tính với các hóa chất và thuốc thử như ở bảng 2.1.

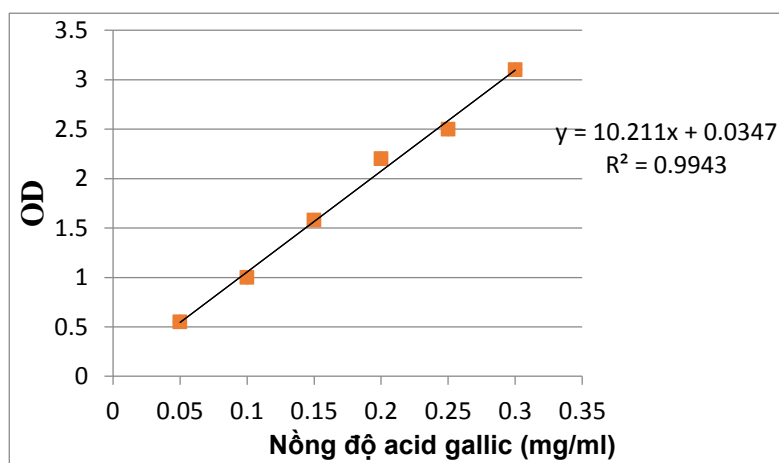
Bảng 2.1. Các phương pháp định tính các hợp chất tự nhiên

Hợp chất được định tính	Thuốc thử	Kết quả phản ứng
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu hồng tới đỏ
Alkaloid	Thuốc thử Wagner	Kết tủa màu nâu đỏ
Terpenoid	Liebermann-Burchard	Đỏ nâu-tím, lớp trên có màu xanh lục
Phenolic và tannin	Dung dịch FeCl ₃	Kết tủa màu xanh đen
Saponin	Dầu oliu, đun nóng 90°C	Nhũ tương màu sữa

2.2.5. Phương pháp định lượng

2.2.5.1. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định thông qua phương pháp Folin – Ciocalteu. Lấy 0,5 ml dịch chiết hoặc dung dịch acid gallic chuẩn (có nồng độ từ 0,05÷3 mg/ml) thêm vào 2,5 ml Folin – Ciocalteu (1:10), lắc đều. Sau 4 phút, thêm vào 2 ml dung dịch Na₂CO₃ bão hòa, lắc đều, ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 760 nm. Acid gallic được sử dụng như là chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số milligam acid gallic/1 gam chất khô (Gallic Acid Equivalent/g Dry weight – GAE/g DW) [10].



Hình 2.1. Đường chuẩn acid gallic dùng để xác định hàm lượng polyphenol tổng số

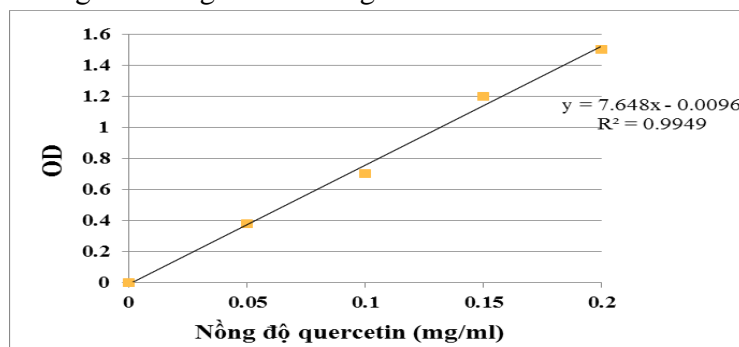
Xây dựng đường chuẩn phenolic với chất chuẩn là acid gallic trong khoảng nồng độ từ 0,05 ÷ 0,3 (mg/ml). Kết quả thu được phương trình hồi quy tuyến tính: $Y = 10,211X + 0,034$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9943$. Trên cơ sở đường chuẩn này ta xác định được hàm

lượng polyphenol tổng số trong các mẫu nghiên cứu.

2.2.5.2. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng tổng flavonoid được xác định thông qua phương pháp tạo màu với AlCl_3 trong môi trường kiềm-trắc quang. 1 ml dịch chiết hoặc dung dịch quercetin chuẩn (có nồng độ từ 0,02÷0,2 mg/ml) thêm vào 4 ml nước cất 2 lần, sau đó, thêm vào 0,3 ml dung dịch NaNO_2 5%. Sau 5 phút thêm tiếp 0,3 ml dung dịch AlCl_3 10%, sau 6 phút cho vào 2 ml dung dịch NaOH 1M và định mức đến thể tích 10 ml bằng nước cất. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng làm chất chuẩn tham khảo và kết quả được quy tương đương theo số milligram quercetin / 1 g dịch chiết khô (mg Quercetin Equivalent/g Dry weight – mg QE/g DW) [10].

Xây dựng đường chuẩn flavonoid với chất chuẩn là quercetin trong khoảng nồng độ từ 0 - 0,2 (mg/ml). Kết quả thu được phương trình hồi quy tuyến tính: $Y = 7,648x - 0,0096$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9949$. Trên cơ sở đường chuẩn này ta xác định được hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu nghiên cứu.

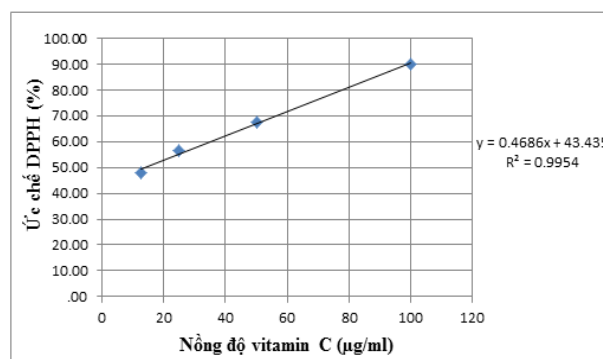


Hình 2.2. Đường chuẩn quercetin dùng để xác định hàm lượng flavonoid tổng số

2.2.6. Xác định hoạt tính chống oxy hóa

Trong nghiên cứu này, phương pháp DPPH được sử dụng để xác định hoạt tính chống oxy hóa vì những ưu điểm của nó so với các phương pháp khác như: đơn giản, thiết bị yêu cầu không quá phức tạp, tiến hành nhanh chóng, thích hợp với nhiều tác nhân chống oxy hóa.

Dịch chiết được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau và trộn với nước cất để đạt thể tích tổng cộng 3 ml. Sau đó thêm 1 ml dung dịch DPPH 0,1 mM (pha trong ethanol 99,5%), lắc đều và để yên trong bóng tối 30 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 517 nm.



Hình 2.3. Đường chuẩn vitamin C

Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$\text{DPPH (\%)} = 100 \times (\text{ACT} - \text{ASP})/\text{ACT}.$$

Trong đó:

ACT: Độ hấp thụ quang học của mẫu trắng không chứa dịch chiết;

ASP: Độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa dịch chiết.

Kết quả báo cáo bởi giá trị IC_{50} là nồng độ dịch chiết mà tại đó nó có thể ức chế 50% gốc tự do DPPH. Giá trị IC_{50} của dịch chiết thân cây xương rồng được so sánh với giá trị IC_{50} của chất chuẩn – Vitamin C.

Từ đồ thị ngoại suy giá trị IC_{50} của vitamin C là 14,01 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.7. Phương pháp phân tích và đánh giá kết quả

Số liệu thô được phân tích ở phòng thí nghiệm sau đó được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 dưới dạng các bảng và biểu đồ.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Độ ẩm thân cây xương rồng bà có gai

Thân cây xương rồng bà có gai là bộ phận được sử dụng chủ yếu của cây. Kết quả xác định độ ẩm của thân cây xương rồng bà có gai ở dạng tươi và dạng bột khô được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Độ ẩm của thân cây xương rồng bà có gai

Mẫu thí nghiệm	Độ ẩm (%)	
	Nguyên liệu tươi	Bột khô
Non	91,05±0,10%	8,64±0,04%
Trưởng thành	90,83±0,11%	8,30 ±0,03%
Già	90,03±0,08%	8,41±0,04%

Kết quả trên cho thấy, hàm lượng nước trong thân cây xương rồng bà có gai ở dạng tươi chiếm tỷ lệ khá cao (hơn 90%) ở cả mẫu non, mẫu trưởng thành, mẫu già và không có sự chênh lệch đáng kể giữa các giai đoạn sinh trưởng của cây.

Do xương rồng thuộc nhóm thực vật mọng nước nên hàm lượng nước chiếm tỉ lệ lớn là hợp lý. Tuy nhiên hàm lượng nước cao làm cho mẫu nguyên liệu tươi dễ bị tác động gây hại từ vi sinh vật không mong muốn. Vì vậy, để thuận tiện cho việc bảo quản cũng như giảm thiểu thể tích nguyên liệu, đối tượng sử dụng cho các nghiên cứu trong đề tài là mẫu bột khô được xử lý từ thân cây xương rồng tươi theo phương pháp ở mục 2.2.1.

Kết quả cho thấy độ ẩm trung bình của các mẫu bột từ thân cây xương rồng non, trưởng thành và già có giá trị lần lượt là 8,64%; 8,30% và 8,41%. Qua đó cho thấy, độ ẩm của các mẫu nguyên liệu này nằm trong giới hạn cho phép bảo quản trong thực tế. Đồng thời, đề tài sử dụng phần trăm độ ẩm này để quy các kết quả phân tích về phần trăm vật chất khô, tạo thuận lợi cho việc so sánh hoạt tính giữa các mẫu phân tích.

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai bằng phương pháp ngâm tĩnh

Đối tượng dùng để nghiên cứu ảnh hưởng các điều kiện chiết đến hoạt tính chống oxy hóa là mẫu bột từ thân xương rồng bà có gai ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau.

3.2.1. Kết quả ảnh hưởng của loại dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch

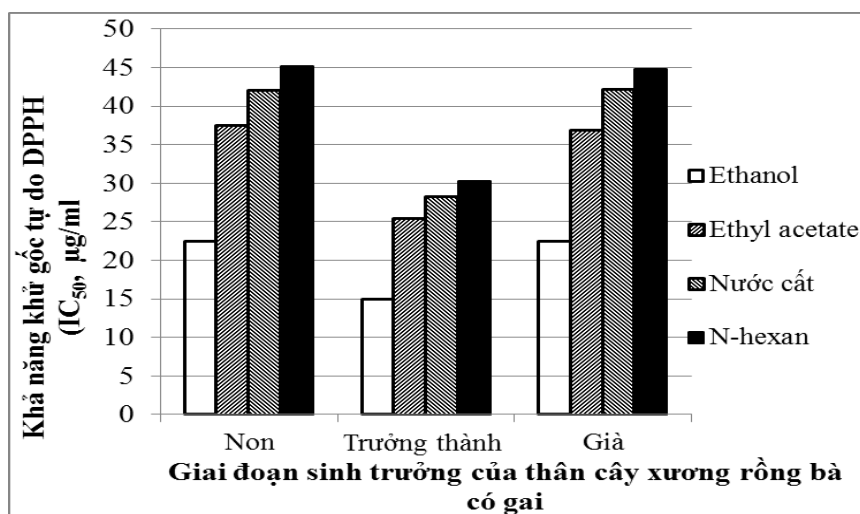
chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Dung môi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Trong nghiên cứu này, các loại dung môi chiết có độ phân cực khác nhau bao gồm ethanol 99,5%, ethyl acetate 99% , n-hexan 99% và nước cất được sử dụng.

Kết quả ở hình 3.1 cho thấy thấy giá trị IC_{50} của các mẫu dịch chiết ethanol thấp hơn đáng kể so với các mẫu dịch chiết bằng các dung môi còn lại. Điều này chứng tỏ hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết ethanol mạnh nhất trong số các dung môi sử dụng trong nghiên cứu. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng hòa tan các hợp chất chống oxy hóa trong dung môi chiết phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi, trong đó ethanol là một trong những dung môi thích hợp nhất, được sử dụng rộng rãi để chiết tách các hợp chất chống oxy hóa từ thực vật [11-12].

Mặc khác, từ kết quả cũng nhận thấy rằng khi chiết bằng cùng một loại dung môi, các mẫu dịch chiết từ thân trưởng thành có giá trị IC_{50} thấp hơn, đồng nghĩa với hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với các mẫu từ thân non và thân già. Mẫu dịch chiết ethanol từ thân xương rồng bà không gai ở giai đoạn trưởng thành có khả năng loại gốc tự do mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 15 $\mu\text{g/ml}$.

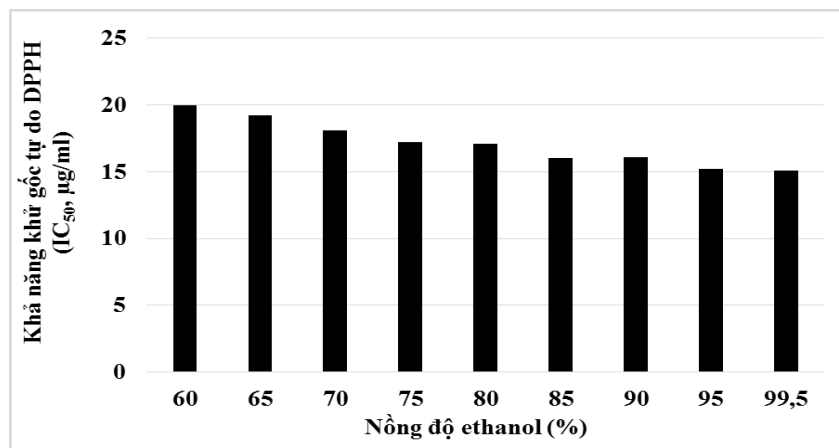
Dựa vào kết quả trên, chúng tôi chọn thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành làm nguyên liệu và dung môi chiết là ethanol để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết và giai đoạn sinh trưởng của thân cây xương rồng bà có gai đến khả năng khử gốc tự do DPPH

3.2.2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

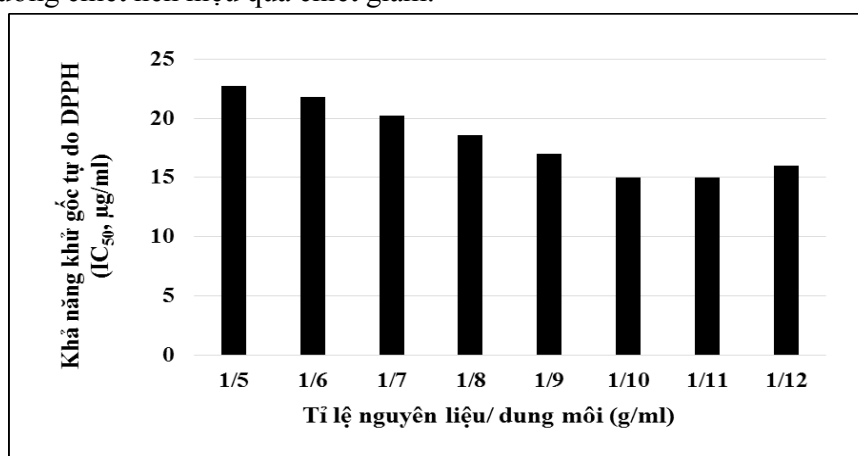
Kết quả cho thấy khi tăng nồng độ ethanol từ 60 lên 95% thì khả năng khử gốc tự do DPPH tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ ethanol từ 95% lên 99,5% khả năng khử gốc tự do DPPH hầu như không thay đổi (Hình 3.2). Vì vậy, nồng độ ethanol 95% được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân xương rồng bà có gai

3.2.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Dựa vào đồ thị ở hình 3.3 ta thấy rằng, khi tỉ lệ nguyên liệu/dung môi NL/DM giảm từ 1/5 xuống 1/10 g/ml thì khả năng khử gốc tự do DPPH tăng lên đáng kể. Công thức chiết mẫu với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi - 1/10 cho kết quả khả năng khử gốc tự do DPPH cao nhất. Tuy nhiên, khi tiếp tục giảm tỉ lệ NL/DM xuống 1/11 và 1/12 thì khả năng chống oxy hóa DPPH không tăng mà có xu hướng giảm. Điều này có thể được lý giải vì khi giảm tỉ lệ NL/DM dẫn đến sự chênh lệch gradient nồng độ của các chất cần chiết trong nguyên liệu với môi trường chiết nên hiệu quả chiết giảm.

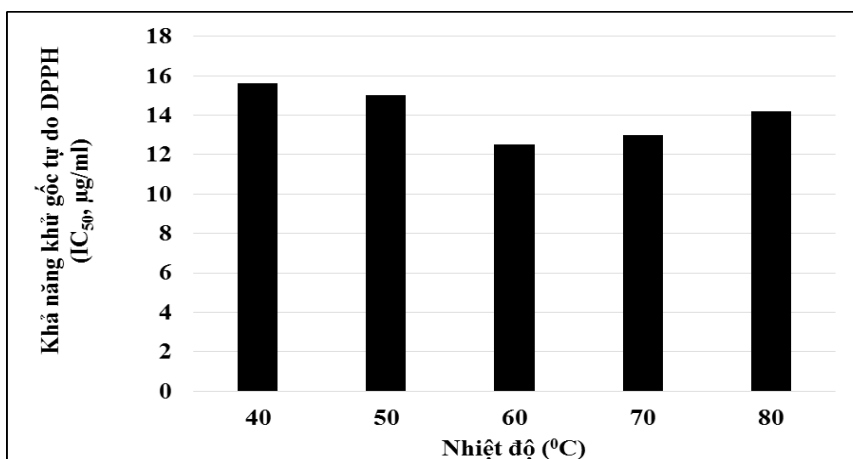


Hình 3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết đến đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Với kết quả của nghiên cứu này, tỉ lệ NL/DM - 1/10 g/ml được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết (40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C) đến hoạt tính chống oxy hóa được trình bày ở hình 3.4.

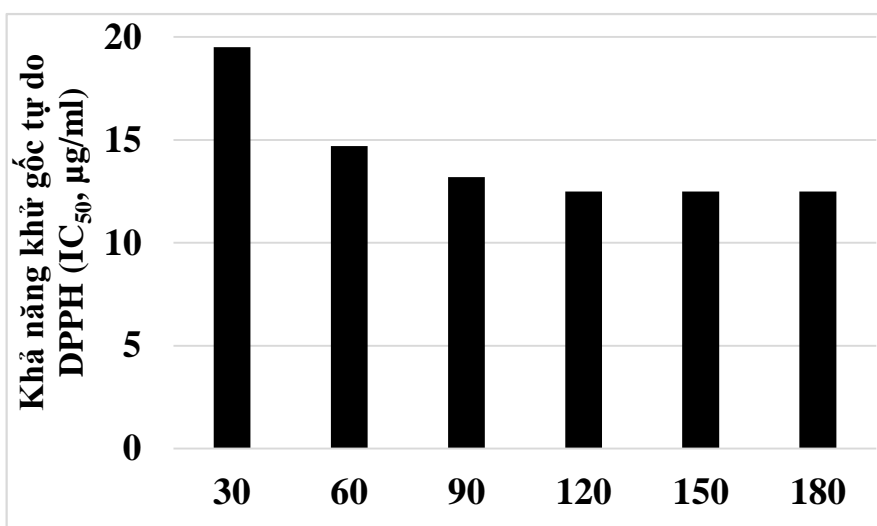


Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng khử gốc tự do DPPH tăng lên theo chiều tăng của nhiệt độ chiết trong khoảng từ 40 đến 60°C. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ chiết từ 60 lên 80°C thì khả năng khử gốc tự do DPPH có xu hướng giảm; giá trị IC₅₀ của dịch chiết tăng từ 12,5 đến 14,2 µg/ml. Ở 60°C dịch chiết có khả năng khử gốc tự do DPPH cao nhất. Dựa trên kết quả thu được, nhiệt độ 60°C được sử dụng để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân xương rồng bà có gai được mô tả trong hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Khi tăng thời gian chiết từ 30 đến 120 phút, khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân xương rồng bà có gai tăng dần tương ứng với giá trị IC₅₀ của dịch chiết giảm dần. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng thời gian chiết từ 120 lên 180 phút thì khả năng chống oxy hóa của dịch chiết cũng như giá trị IC₅₀ của dịch chiết hầu như không thay đổi. Từ kết quả

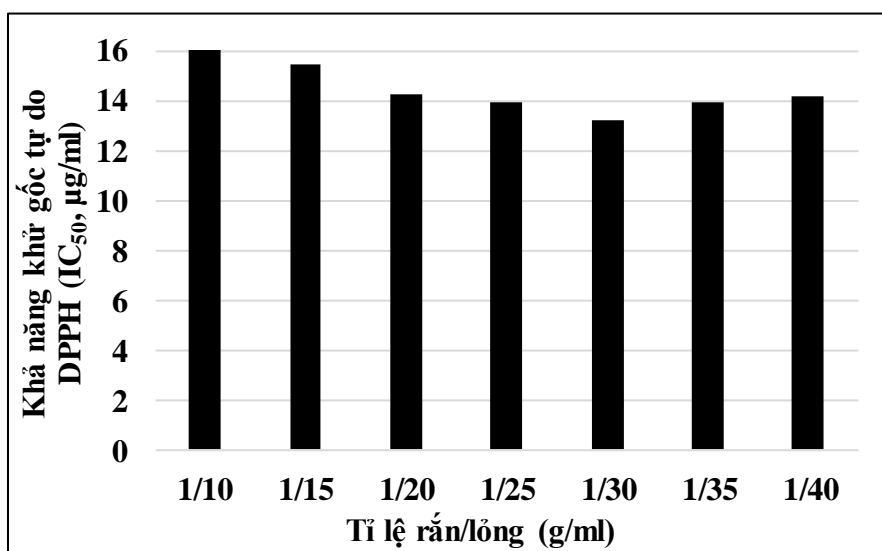
phân tích trên cho thấy thời gian thích hợp cho quá trình chiết là 120 phút.

Từ những nghiên cứu trên đã xác định được điều kiện tách chiết thích hợp để thu được dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa cao từ thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành: dung môi ethanol 95%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10g/ml, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 120 phút. Trong điều kiện này, khả năng khử gốc tự do DPPH có giá trị IC_{50} tương ứng là $12,5 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$.

3.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp chiết Soxhlet

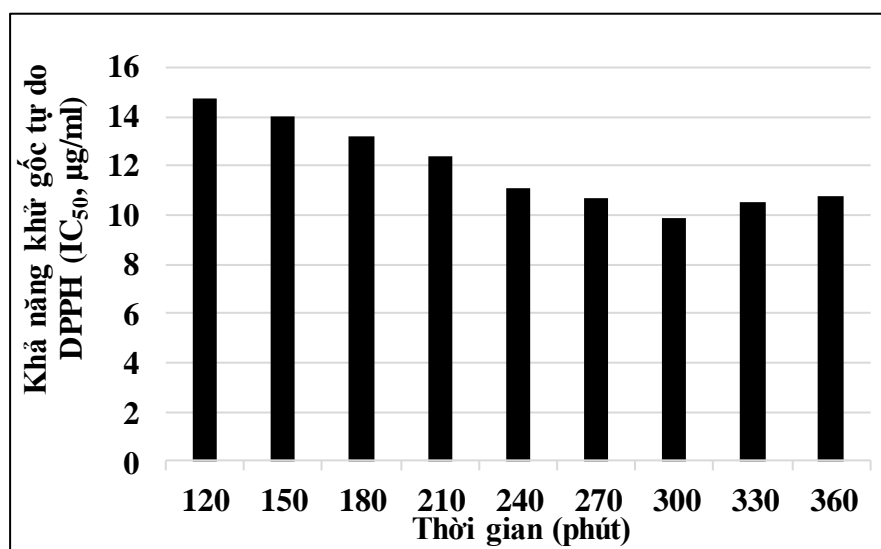
Trên cơ sở kết quả tách chiết các hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp ngâm tĩnh, đề tài tiếp tục khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành bằng phương pháp chiết Soxhlet. Hai yếu tố được khảo sát là tỉ lệ rắn/lỏng và thời gian chiết.

Dựa vào đồ thị ở hình 3.6 ta thấy rằng, công thức chiết mẫu với tỉ lệ rắn/lỏng - 1/30 cho kết quả khả năng khử gốc tự do DPPH cao nhất. Khi giảm tỉ lệ nguyên liệu/dung môi giảm xuống 1/35 thì khả năng chống oxy hóa DPPH có xu hướng giảm. Vì vậy, tỉ lệ rắn/lỏng -1/30 được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của tỉ lệ rắn/lỏng đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân xương rồng bà có gai

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết Soxhlet ở hình 3.7 cho thấy, khả năng khử gốc tự do DPPH tăng dần trong khoảng thời gian từ 120 phút đến 300 phút. Tuy nhiên, khi tăng thời gian chiết từ 300 giờ lên 360 giờ, khả năng khử gốc tự do DPPH có xu hướng giảm. Thời gian chiết 300 phút (5 giờ) cho giá trị IC_{50} của dịch chiết thấp nhất – 9,9 $\mu\text{g/ml}$, đồng nghĩa với thời gian chiết này, dịch chiết có khả năng khử gốc tự do DPPH cao nhất.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của thời gian chiết Soxhlet đến khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy, phương pháp chiết Soxhlet cho hiệu quả tách chiết các hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* cao hơn so với phương pháp ngâm tĩnh. Với những điều kiện chiết thích hợp bằng phương pháp chiết Soxhlet, IC₅₀ đạt giá trị là 9,9 µg/ml, thấp hơn so với IC₅₀ của mẫu đối chứng vitamin C (14,01 µg/ml). Qua đó cho thấy, thân cây xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* thể hiện khả năng chống oxy hóa rất mạnh, có thể là nguồn nguyên liệu tiềm năng để chiết xuất chất chống oxy hóa tự nhiên.

3.4. Định tính các nhóm chất và xác định hàm lượng các hợp chất chống oxy hóa của dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

3.4.1. Định tính các nhóm chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết

Kết quả định tính các nhóm chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết ethanol từ thân cây xương rồng bà có gai cho thấy sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, terpenoid, saponin, phenolic và tannin (Bảng 3.2). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Opuntia* với nhóm hợp chất chính là flavonoid [13-16].

Bảng 3.2. Bảng kết quả các phản ứng định tính các nhóm chất có trong dịch chiết từ thân xương rồng bà có gai

Nhóm hợp chất	Thuốc thử	Kết quả định tính	Kết quả
Flavonoid	Mg/HCl đậm đặc	++	Có
Alkaloid	Thuốc thử Wagner	-	Không
Terpenoid	Liebermann-Burchard	+	Có
Phenolic và tannin	Dung dịch FeCl ₃	+	Có
Saponin	Dầu oliu, đun nóng 90°C	+	Có

Chú thích: (-): Phản ứng âm tính. (++) : Phản ứng dương tính rõ
(+): Phản ứng dương tính.

3.4.2. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid tổng số trong dịch chiết

Polyphenol là nhóm chất chống oxy hóa có khả năng ngăn chặn các chuỗi phản ứng dây chuyền bằng cách phản ứng trực tiếp với gốc tự do đó tạo thành một gốc tự do mới bền hơn, hoặc cũng có thể tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp vốn là xúc tác cho quá trình tạo gốc tự do. Flavonoid là một nhóm hợp chất chống oxy hóa nổi bật nhất thuộc nhóm polyphenol, có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhờ sự có mặt của các nhóm hydroxyl nhân thơm. Các nghiên cứu đã khẳng định rằng, hàm lượng của polyphenol và flavonoid quyết định đến khả năng chống oxy hóa của các loài xương rồng thuộc chi *Opuntia*. Vì vậy, hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) và flavonoid tổng số (TFC) là hai trong số các chỉ tiêu quan trọng cần khảo sát để đánh giá khả năng chống oxy hóa của cây xương rồng bà có gai.

Dịch chiết thu được trong những điều kiện thích hợp bằng phương pháp ngâm tĩnh và chiết Soxhlet từ mẫu bột thân cây xương rồng bà có gai ở giai đoạn trưởng thành được sử dụng để xác định hàm lượng TPC và TFC.

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy phương pháp tách chiết có ảnh hưởng đến khả năng trích ly các hợp chất chống oxy hóa có trong mẫu. Hàm lượng TPC và hàm lượng TFC của các mẫu dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai khi chiết bằng phương pháp Soxhlet cao hơn so với phương pháp ngâm tĩnh.

Bảng 3.3. Hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số của các mẫu dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai

Phương pháp chiết	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/ DW)
Ngâm tĩnh	118,35±1,65	40,01±0,15
Chiết Soxhlet	143,14±1,71	50,46±0,25

Kết quả hàm lượng TPC và hàm lượng TFC của dịch chiết từ thân của loài xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* mọc tại Phú Yên khá cao so với các nghiên cứu khảo sát trên loài xương rồng *Opuntia ficus-indica* ở Italia, Hàn Quốc, Ma Rốc, Algeria [5, 17-18, 20] và các loài xương rồng họ *Opuntia* được trồng ở vùng Pernambuco, miền bắc Brasil [2]. So với kết quả của một nghiên cứu khác [3], hàm lượng TPC và TFC của loài *Opuntia dillenii* mọc tại Phú Yên cũng nằm trong khoảng dao động hàm lượng TPC và TFC (với giá trị lần lượt là 103,0-549,2 mg GAE/g DW và 16,2-221,7 mg QE/g DW) của loài *Opuntia ficus-indica* ở Tunisia.

Bảng 3.4. Hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid tổng số trong thân một số loài xương rồng thuộc chi *Opuntia* trên thế giới

Loài xương rồng	Nơi sinh trưởng	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/ DW)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Hàn Quốc	18,0-71,4	6,4-25,0
	Ma Rốc	73,1-111,2	22,0-27,0
	Tunisia	103,0-549,2	16,2-221,7
<i>Opuntia ficus-indica</i> <i>Opuntia stricta</i> <i>Opuntia atropes</i> <i>Opuntia larrer</i>	Brasil	1,24-5,41	0,90-3,43

<i>Opuntia ficus-indica</i>	Algeria	26,7	11,86
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Italia	2,633	-

Sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do sự khác nhau về giống loài, thời điểm thu hái, điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng ở khu vực trồng nguyên liệu và phương pháp tách chiết khác nhau.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện tách chiết thích hợp khi chiết bằng 2 phương pháp: ngâm tĩnh và chiết Soxhlet để thu được dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa cao từ thân cây xương rồng bà có gai (*Opuntia dillenii*) ở giai đoạn trưởng thành mọc ở tỉnh Phú Yên. Phương pháp chiết Soxhlet cho hiệu quả tách chiết các hợp chất chống oxy hóa từ thân cây xương rồng bà có gai cao hơn so với phương pháp ngâm tĩnh. Điều kiện thích hợp để tách chiết các hợp chất chống oxy hóa bằng phương pháp chiết Soxhlet như sau: dung môi ethanol 95%, tỷ lệ rắn/lỏng là 1/30, nhiệt độ chiết - 78 °C, thời gian chiết là 5 giờ.

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học cho thấy trong thành phần dịch chiết ethanol từ thân cây xương rồng bà có gai có sự hiện diện của các nhóm chất flavonoid, terpenoid, saponin, phenolic và tannin.

Dịch chiết từ thân cây xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* mọc ở tỉnh Phú Yên có hàm lượng polyphenol tổng số, flavonoid tổng số và hoạt tính chống oxy hóa khá cao. Trong những điều kiện chiết thích hợp bằng phương pháp chiết Soxhlet, mẫu dịch chiết từ thân cây xương rồng bà không gai ở giai đoạn trưởng thành có khả năng loại gốc tự do mạnh với giá trị IC₅₀ là 9,99 µg/ml, thấp hơn giá trị IC₅₀ của vitamin C (14 µg/ml). Qua đó cho thấy, thân cây xương rồng bà có gai *Opuntia dillenii* thể hiện khả năng chống oxy hóa rất mạnh, có thể là nguồn nguyên liệu tiềm năng để chiết xuất chất chống oxy hóa tự nhiên □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hartmut, B (2008), *Opuntia dillenii* – An Interesting and Promising Cactaceae Taxon”, *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 10, pp.148 - 170.
- [2] Francisco Abel Lemos ALVES, Albericio Pereira de ANDRADE, Riselane de Lucena Alcântara BRUNO, Maria Goretti de Vasconcelos SILVA, Maria de Fátima Vanderlei de SOUZA, Djalma Cordeiro dos SANTOS (2017), Seasonal variability of phenolic compounds and antioxidant activity in prickly pear cladodes of *Opuntia* and *Nopalea* genres, *Food Sci. Technol* vol.37, no.4.
- [3] Sana BAKARI, Amal DADUD, Samir FELHI, Slim SMADUI, Néji GHARSALLAH, Adel KADRI (2017), Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode, *Food Sci. Technol*, Campinas, 37 (2):286-293.
- [4] Chang, SF, Hsieh, CL & Yen, GC (2008), The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds”, *Food Chemistry*, 106, pp. 569 - 575.
- [5] Gabriele Rocchetti, Marco Pellizzoni, Domenico Montesano, Luigi Lucini

- (2018), Italian *Opuntia ficus-indica* Cladodes as Rich Source of Bioactive Compounds with Health-Promoting Properties. *Foods* , 7 (2) , 24.
- [6] Lương Huỳnh Ngọc Diễm (2013), Nghiên cứu quy trình chiết tách pectin từ lá xương rồng bàn chải (*Opuntia dillenii*) và khảo sát khả năng ứng dụng dịch chiết từ lá xương rồng này làm màng bảo quản trái cây, Đồ án tốt nghiệp, Trường Đại học Kỹ Thuật Công Nghệ TP. Hồ Chí Minh.
- [7] Tạ Thu Hằng (2017), Nghiên cứu về hoạt tính sinh học hạ đường huyết và hạ cholesterol máu của một số nhóm hoạt chất chính từ cây Nopal (*Opuntia spp*) được nhập vào Việt Nam, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [8] Sofowora, A..1993. Screening Plants for Bioactive Agents. In: Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa, ed. Sofowora, A., Ibadan: Spectrum Books Ltd, pp. 134-156.
- [9] Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98-106
- [10] Naczka, M. and Shahidi, F (2004), Extraction and Analysis of Phenolics in Food, *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
- [11] Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J (2007), Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage, *Food chemistry*, 105: 1268 - 1275.
- [12] Wang, J., Sun, B.G., Cao, Y., Tian, Y., Li, X.H. (2008), Optimization of ultrasound - assisted extraction of phenolic compound from wheat bran, *Food chemistry*, 106: 804 – 809.
- [13] Feugang, J.M.; Konarski, P.; Zou, D.; Stintzing, F.C.; Zou, C (2006), Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia spp.*) cladodes and fruits, *Front. Biosci.* 11, pp. 2574–2589.
- [14] El-Mostafa, K.; El Kharrassi, Y.; Badreddine, A.; Andreoletti, P.; Vamecq, J.; El Kebbaj, M.S.; Latruffe, N.; Lizard, G.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 2014, 19, 14879–14901.
- [15] Francisco Abel Lemos Alves, Albericio Pereira de Andrade, Riselane de Lucena A Bruno, Djalma Cordeiro dos Santos, Andre Luiz Rodrigues Magalhaes, Divan Soares da Silva. Chemical and Nutritional Variability of Cactus Pear Cladodes, Genera *Opuntia* and *Nopalea*. *American Journal of Food Technology* **2017**, 12 (1), 25-34. DOI: 10.3923/ajft.2017.25.34.
- [16] Bargougui A, Tag H. M, Bouaziz M, Triki S. (2019), Antimicrobial, Antioxidant, Total Phenols and Flavonoids Content of Four Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Cultivars. *Biomed Pharmacol J.*; 12(3).
- [17] Larbi Allai, EL Mostafa Karym et al. (2017), Evaluation of Antioxidant Activity and Phenolic Composition of *Opuntia ficus-indica* Cladodes Collected from Moroccan Settat Region, *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(1):105-117.
- [18] Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J. and Jang, Y.S (2002), Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten, *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* 50: 6490-6496.
- [19] Bùi Thị Thu Hằng (2017), Nghiên cứu thu nhận, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của pectin từ cây xương rồng bàn chải (*Opuntia dillenii*) tại tỉnh Ninh Thuận, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nha Trang.
- [20] Hanane Dib, M. Choukri Beghdad, Meriem Belarbi, Meryem Seladji & Meriem Ghalem, "Antioxidant activity of phenolic compounds of the cladodes of *Opuntia ficus-indica* Mill. from northwest Algeria", *Pharmaceutical Sciences (IJMPS)*, Vol. 3, Issue 4, Oct 2013, 147-158.
- [21] Izuegbuna O, Otunola G, Bradley G (2019), Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Opuntia stricta* cladodes. *PLoS ONE* 14(1): e0209682.
- [22] A. du Toit, M. de Wit, G. Osthoff, A. Hugo (2018). Antioxidant properties of fresh and processed cactus pear cladodes from selected *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta* cultivars. *South African Journal of Botany*, 118, 44-51. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.06.014.
- [23] C.E. Aruwa, S.O. Amoo, T. Kudanga (2019). Extractable and macromolecular antioxidants of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Phytochemical profiling, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 125, 402-410. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.08.007.

**Study on extraction and antioxidant activity of extracts of *Opuntia dillenii*
(Ker Gawl.) Haw. Cladodes grown in Phu Yen province**

Phan Quynh Tram* , Huynh Thi Ngoc Ni

Phu Yen University

* Email: quynhtram221@gmail.com

Received: December 04, 2019; Accepted: February 10, 2020

Abstract

*The research results showed that Soxhlet extraction method gave higher anti-radical property compared with maceration. By using Soxhlet extraction method, alcohol (95%), alcohol: sample rate (1:30), temperature (78°C), time (5 hours) can extract cladodes of *Opuntia dillenii* most efficiently. This extract showed high total polyphenol content $143,14 \pm 1,71$ mg/g gallic acid equivalents and high total flavonoid content $50,46 \pm 0,25$ mg/g quercetin equivalents. This study also evaluated the ability to capture free radicals DPPH of this extract ($IC_{50} = 9,9 \mu\text{g/ml}$) in comparison with vitamin C ($IC_{50} = 14,02 \mu\text{g/ml}$). Thus, the extracts of *Opuntia dillenii* cladodes is a source of antioxidant phenolic compounds and will be probably used for the development of functional foods or drug formulations.*

Key words: *Opuntia dillenii*, extract, total polyphenol content, total flavonoid content, antioxidant activity