

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ CỦA CAO FLAVONOID TỪ LÁ BẦN CHUA (SONNERATIA CASEOLARIS)

Đoàn Văn Hậu⁽¹⁾, Hồ Như Thạch⁽¹⁾, Trịnh Thị Thanh Lệ⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Trà Vinh

Ngày nhận bài 08/08/2024; Chấp nhận đăng 6/11/2024

Liên hệ email: dvhau@tvu.edu.vn

Tóm tắt

Cây bần chua hay bần sẻ được trồng nhiều ở khu vực ven biển và ven sông, đặc biệt cây rất thích hợp với vùng nước lợ ở Việt Nam có tên khoa học là *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl., thuộc họ Sonneratiaceae. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng chống oxy hoá của cao flavonoid chiết xuất từ lá bần chua. Bột lá bần chua được chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong ethanol 70%, dịch chiết sau đó được đông khô trong điều kiện áp suất giảm dần. Nghiên cứu đã tiến hành định lượng flavonoid tổng và khảo sát khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp trung hoà gốc tự do DPPH và ABTS. Kết quả định lượng cho thấy cao có hàm lượng flavonoid tổng là 140,73mg QE/g cao khô. Khả năng trung hoà gốc tự do DPPH và ABTS cao của cao flavonoid lá bần chua được thể hiện qua giá trị ức chế 50% (IC₅₀) lần lượt là 10,42 ± 0,35µg/mL và 9,63 ± 0,16µg/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao flavonoid lá bần chua có khả năng chống oxy hoá, khả năng này có thể góp phần tạo nên những tác dụng hữu ích trong hỗ trợ điều trị các bệnh có liên quan đến sự mất cân bằng oxy hoá trong cơ thể.

Từ khoá: ABTS, bần chua, chống oxy hoá, DPPH, *Sonneratia caseolaris*

Abstract

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF FLAVONOIDS EXTRACTED FROM MANGROVE APPLE LEAVES (SONNERATIA CASEOLARIS)

Mangrove apple, also called crabapple mangrove, is popular growth in the coastal or riverside areas, especially in saltwater area in Viet Nam. The scientific name is *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. which belongs to the family of Sonneratiaceae. This study aimed to investigate the antioxidant potential of flavonoids extracted from *S. caseolaris* leaves. *S. caseolaris* leaves powder was extracted by ultrasonic method in ethanol 70%, the extract was freeze-dried under reducing pressure then. Total flavonoids were measured and in vitro antioxidant potential of the extract was evaluated by DPPH and ABTS assays. The result showed that total flavonoid contents in the extract was 140,73mg QE/g dried extract. Free radical scavenging activity of the extract to DPPH and ABTS were determined with IC₅₀ = 10.42 ± 0.35µg/mL and 9.63 ± 0.16µg/mL, respectively. These results revealed the antioxidant potential of flavonoids extracted from *S. caseolaris* leaves. This ability may contribute to helpful effects in the treatment of diseases related to oxidative imbalance conditions in humans.

1. Đặt vấn đề

Stress oxy hóa là một tình trạng mất cân bằng xảy ra khi nồng độ của các gốc tự do vượt hơn khả năng chống oxy hóa của cơ thể. Bình thường, cơ thể người nồng độ này cần được kiểm soát ở mức độ cân bằng với khả năng chống oxy hóa của cơ thể. Tuy nhiên, điều kiện môi trường sống, yếu tố dinh dưỡng và thói quen uống rượu bia, hút thuốc lá, ... làm giảm khả năng bảo vệ của hàng rào chống oxy hoá của cơ thể gây ra stress oxy. Gốc tự do sẽ phá hủy cấu trúc và chức năng của các đại phân tử sinh học bao gồm protein, enzyme, axit nucleic, ... gây tổn thương đến tế bào, mô và cơ thể. Đây cũng là tác nhân của nhiều loại bệnh khác nhau ở người nhất là các bệnh mạn tính như các bệnh liên quan đến thần kinh, tim mạch, rối loạn các hoạt động chuyển hóa, gây viêm hoặc gây ung thư (Nguyễn Công Khanh & Nguyễn Hoàng Nam, 2022).

Thực vật đã được chứng minh là có khả năng sản xuất ra những hợp chất biến dưỡng thứ cấp chống oxy hoá để làm giảm tác động gây hại của gốc tự do có nguồn gốc từ oxy gây ra (ROS). Nhiều hợp chất biến dưỡng thứ cấp được khám phá từ thực vật như alkaloid, terpenoid, carotenoid, phenolic. Trong đó, flavonoid là những hợp chất của phenolic thiên nhiên, có hoạt tính chống oxy hoá mạnh (Liga, Paul & Péter, 2023).

Cây bần chua (*Sonneratia caseolaris* (L.) Engl.) thuộc họ Sonneratiaceae, còn được gọi là bần sè. Bần chua thuộc loại cây gỗ cao 10-15m, có khi cao tới 25m. Cành non màu đỏ, 4 cạnh, có đốt phình to. Cây có nhiều rễ thở mọc thành từng khóm quanh gốc. Cây có kiểu lá đơn, 2 lá đối nhau, phiến dày, lá trưởng thành giòn, phiến bầu dục hoặc trái xoan, đầu phiến lá tròn hoặc nhọn. Cuống và phần đầu của gân chính có màu đỏ, gân giữa nổi ở 2 mặt, cuống lá có chiều dài 0,5-1,5cm. Hoa đơn độc hoặc dạng xim 2 ngã, ở đầu cành, có 2-3 hoa. Đài hoa dính, có 6 cánh đài dày, dai, màu lục bên ngoài, màu tím hồng bên trong. Cánh hoa 6, đỏ, nhị có chỉ hình sợi, trắng ở phần đầu và đỏ ở phần đáy (hình 1). Quả mọng, màu xanh, ăn được, gốc có 6-8 thùy đài xoè rộng. Hạt nhiều, dẹt. Mùa hoa khoảng tháng 3-4, quả chín tháng 5-9. Cây ưa sống ở vùng nước lợ, ưa sáng, chịu hạn kém (Lê Đức Tuấn, Trần Thị Kiều Oanh, Cát Văn Thành, & Quý, 2002). Vỏ thân, lá hay quả cây đã được chứng minh có nhiều khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và ức chế enzyme cholinesterase (Audah và cs., 2022; Bakar và cs., 2020; Bokshi và cs., 2020; Munira và cs., 2019).



Hình 1. Lá và hoa của cây bần chua

Ở Việt Nam, cây bần được trồng nhiều ở vùng ven biển hoặc ven sông rạch để giữ đất, do đó nguồn nguyên liệu lá bần rất phong phú. Nghiên cứu này khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của chiết xuất flavonoid từ lá bần chua nhằm góp phần cung cấp thông tin khoa học hữu ích về tiềm năng hỗ trợ điều trị các bệnh có liên quan đến sự mất cân bằng oxy hoá trong cơ thể của nguồn nguyên liệu tự nhiên này.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Lá bần chua được thu hái vào tháng 11-12 năm 2023, tại Xã Hoà Minh, huyện Châu Thành, tỉnh Trà Vinh. Sau khi thu hái xong, lá bần được rửa qua nước, để ráo và làm khô ở 20°C. Sau 7 ngày, lá khô có ẩm độ $\leq 5\%$ được xay nhuyễn và dùng để chiết xuất flavonoid.

2.2. Chiết xuất dược liệu

Phương pháp chiết xuất siêu âm trong ethanol 70% được sử dụng để chiết xuất flavonoid từ lá bần theo nghiên cứu của Ngô Thị Huỳnh Mai và cộng sự. (2022) với một vài thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. 50g bột lá bần được chiết xuất trong 500mL cồn 70% trong 40 phút trong bể siêu âm, quá trình chiết được lặp lại cho đến khi dung môi chiết được có gần như không màu (lặp lại 3 lần), các dịch chiết được trộn đều với nhau, cô quay và làm khô bằng máy đông khô dưới áp suất thấp trong 72 giờ. Cao flavonoid khô (sau đây được gọi là cao flavonoid) được trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3. Định tính và định lượng flavonoid tổng số

Định tính: sự hiện diện của flavonoid trong cao được khảo sát thông qua phản ứng với dung dịch NaOH 10%, Cyanidin và FeCl₃.

Định lượng: dựa vào phương pháp được mô tả trước đây (Bag, Devi, & Bhaigyabati, 2015) có hiệu chỉnh. Hỗn hợp 2mL gồm cao flavonoid: nước (1:1) được lắc đều trước khi thêm vào 200 μ L NaNO₂ 5%. Sau đó để yên ống nghiệm phản ứng trong 5 phút rồi tiếp tục thêm 200 μ L dung dịch AlCl₃ 10% vào và trộn đều. Sau 6 phút ủ, tiếp tục thêm 2mL NaOH 1M vào phản ứng. Cuối cùng, thêm nước vừa đủ 5mL và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 510nm. Quercetin được sử dụng để xây dựng đường chuẩn.

Hàm lượng flavonoid tổng số được tính theo công thức: $TFC = C \times k \times V/m$

Trong đó:

TFC là hàm lượng flavonoid tổng số (mg QE/g cao khô)

C là giá trị x tính được dựa vào phương trình đường chuẩn

k là hệ số pha loãng

V là thể tích phản ứng

m là khối lượng cao chiết có trong V

2.4. Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Thử nghiệm năng lực trung hoà gốc tự do DPPH được mô tả bởi Sharma và Bhat (2009). Dung dịch DPPH ở nồng độ 1000 μ g/mL được chuẩn bị trong methanol và tránh ánh sáng trực tiếp. Thành phần phản ứng gồm 40 μ L DPPH và 960 μ L cao flavonoid có nồng độ tăng dần như sau 0, 1, 2, 4, 8 và 16 μ g/mL. Hỗn hợp phản ứng sau đó được để yên trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút để phản ứng trung hòa gốc tự do DPPH xảy ra. Cường độ màu của dung dịch DPPH được đo ở bước sóng 517nm.

Hiệu suất trung hòa DPPH được tính theo công thức:

$$\% \text{Ức chế} = [(A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{mẫu}}) / A_{\text{đối chứng}}] \times 100.$$

Trong đó: $A_{\text{đôi chứng}}$ là độ hấp thu quang phổ của đối chứng methanol; $A_{\text{mẫu}}$ là độ hấp thu quang phổ của mẫu cao flavonoid.

Trolox được sử dụng làm đối chứng dương. Đây là một chất chống oxy hóa mạnh, được sử dụng làm đối chứng phổ biến trong các thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa. Giá trị nồng độ ức chế DPPH 50% (IC_{50}) được dùng để thể hiện khả năng ức chế DPPH của cao thử nghiệm.

2.5. Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do ABTS

Phương pháp trung hòa ABTS• được mô tả bởi Nenadis, Wang, Tsimidou, and Zhang (2004). Chuẩn bị thuốc thử ABTS•: Gốc tự do ABTS• được tạo ra từ phản ứng giữa 14mM ABTS và 4,9mM $K_2S_2O_8$ (tỉ lệ 1:1) thời gian 16 giờ trong bóng tối. Sau đó, dung dịch gốc tự do ABTS• được pha loãng bằng ethanol cho đến khi đạt được giá trị OD = $0,70 \pm 0,05$ tại bước sóng 734nm. Phản ứng được tiến hành như sau: thêm 10 μ L cao chiết với nồng độ tăng dần (0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/mL) vào 990 μ L ABTS• có sẵn trong ống nghiệm. Phản ứng được để xảy ra trong điều kiện nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng, thời gian 6 phút. Kết thúc phản ứng, cường độ màu của dung dịch phản ứng được kiểm tra độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 734nm. Trolox (nồng độ 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/mL) được sử dụng làm đối chứng dương. Đối chứng âm là ethanol không có cao flavonoid.

Hiệu suất trung hòa gốc tự do ABTS• được tính bằng công thức

$$\% \text{ Ức chế} = [(A_{\text{đôi chứng}} - A_{\text{mẫu}}) / A_{\text{đôi chứng}}] \times 100.$$

Trong đó: $A_{\text{đôi chứng}}$ là độ hấp thu quang phổ của hỗn hợp ABTS• và ethanol; $A_{\text{mẫu}}$ là độ hấp thu quang phổ của hỗn hợp ABTS• và cao flavonoid.

Kết quả hoạt tính trung hòa gốc tự do ABTS• của cao được biểu diễn bằng giá trị của nồng độ ức chế 50% (IC_{50}).

2.6. Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại và trình bày kết quả dưới dạng Trung bình \pm độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được ghi nhận khi $P < 0,05$ bằng phân tích ANOVA một chiều và kiểm định SNK.

3. Kết quả và thảo luận

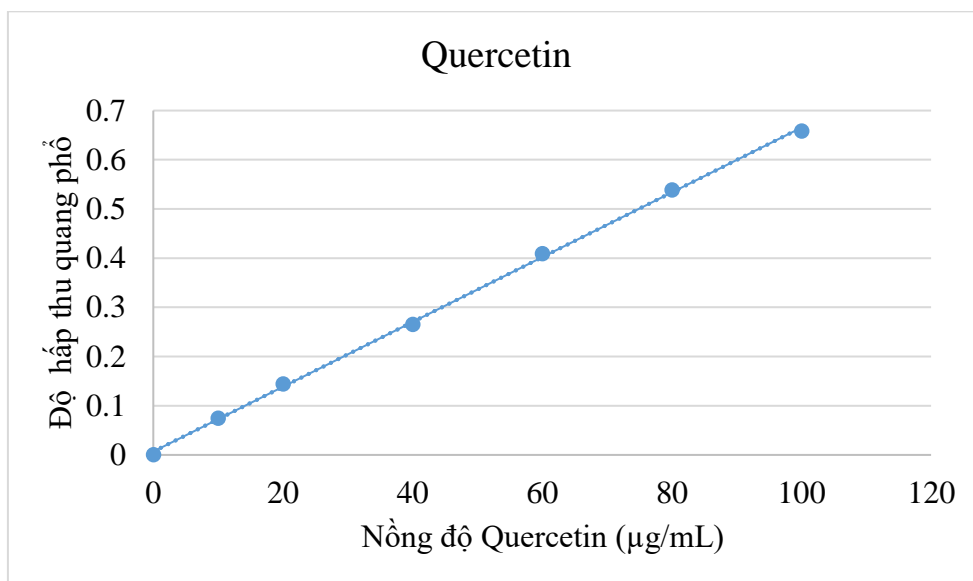
3.1. Định tính và định lượng flavonoid tổng số

Kết quả từ phương pháp định tính khẳng định có flavonoid trong chiết xuất flavonoid lá bần với cả 3 phương pháp phản ứng cyanidin, phản ứng với dung dịch $FeCl_3$ 5%, phản ứng với NaOH 10%.

Bảng 1. Kết quả định tính flavonoid

STT	Phương pháp	Hiện tượng	Kết quả quan sát
1	Phản ứng Cyanidin	Sau vài phút chuyển từ màu vàng sang màu đỏ.	Có
2	Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$ 5%.	Xuất hiện màu xanh đen	Có
3	Phản ứng với NaOH 10%	Xuất hiện kết tủa màu vàng, sau đó kết tủa bị hòa tan trong lượng dư dung dịch NaOH 10 %	Có

Hàm lượng flavonoid tổng của mẫu cao được tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn của quercetin (hình 2). Kết quả phân tích đường chuẩn có công thức $y=0,0066x+0,0068$, $R^2=0,9994$.

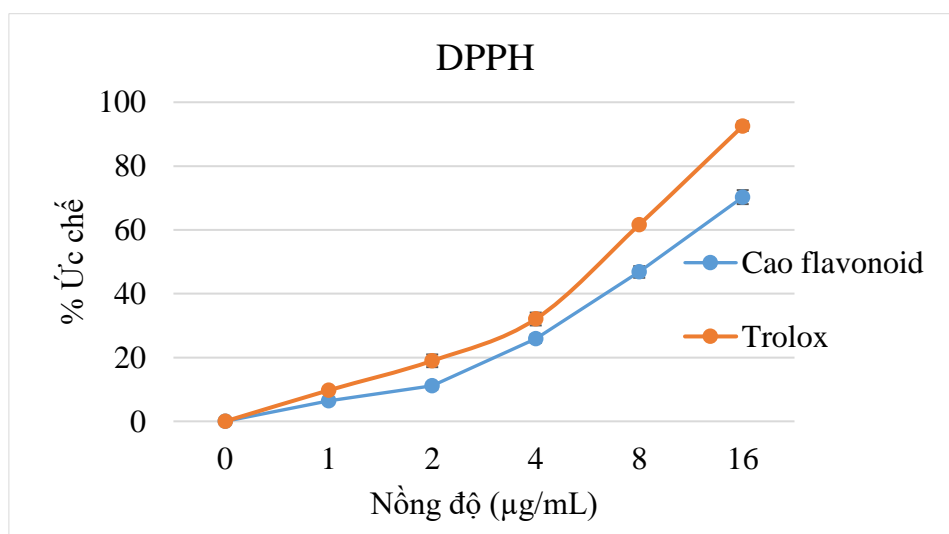


Hình 2. Đường chuẩn Quercetin

Thay giá trị độ hấp thu của 3 lần đo mẫu cao vào công thức tính được hàm lượng flavonoid tổng đạt được là $140,73 \pm 10,97$ (mg QE/g cao).

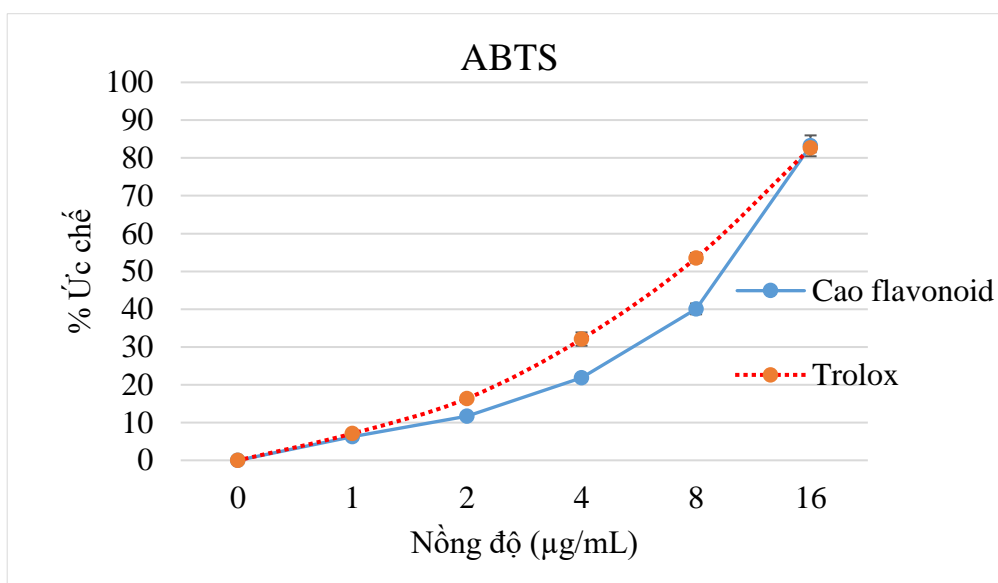
3.2 Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Kết quả khảo sát cho thấy cao flavonoid lá bần có khả năng trung hoà gốc tự do DPPH với giá trị $IC_{50} = 10,42 \pm 0,35$ (µg/mL), hoạt tính này yếu hơn so với Trolox $IC_{50} = 7,63 \pm 0,13$ ($P < 0,05$). Khả năng ức chế gốc tự do DPPH của cao flavonoid tỉ lệ thuận với nồng độ của nó (hình 3). Khi nồng độ tăng thì khả năng ức chế gốc tự do DPPH càng mạnh. Tại nồng độ khảo sát cao nhất (16µg/mL), khả năng ức chế DPPH của cao đạt $70 \pm 2,19\%$ và Trolox đạt $92 \pm 1,50\%$.



Hình 3. Khả năng trung hoà gốc tự do DPPH của cao flavonoid và Trolox

3.2 Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do ABTS



Hình 4. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS của cao flavonoid và Trolox

Kết quả khảo sát thể hiện cao flavonoid có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS• mạnh với giá trị $IC_{50} = 9,63 \pm 0,16$ ($\mu\text{g/mL}$), tuy nhiên khi so sánh với Trolox thì khả năng này yếu hơn ($IC_{50 \text{ Trolox}} = 8,70 \pm 0,02$) ($P < 0,05$). Hình 4 thể hiện khả năng bắt gốc tự do ABTS• của cao flavonoid có xu hướng tỉ lệ thuận với nồng độ, hiệu quả bắt gốc càng mạnh khi nồng độ cao flavonoid trong phản ứng càng tăng. Tại nồng độ $1\mu\text{g/mL}$, cao flavonoid đã ức chế ABTS ở mức độ thấp $6,3 \pm 0,38\%$, ở nồng độ khảo sát cao nhất ($16\mu\text{g/mL}$), khả năng ức chế ABTS• của cao flavonoid đạt $83 \pm 2,76\%$.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, sự hiện diện của flavonoid trong mẫu cao được khẳng định bằng phương pháp định tính với sắt (III) clorua, cyanidin và NaOH loãng. Những phản ứng hoá học này cũng được sử dụng để xác định sự hiện diện của flavonoid trong báo cáo trước đó (Ngô Thị Quỳnh Mai và cs., 2022). Hàm lượng flavonoid tổng của cao flavonoid lá bần trong nghiên cứu này cao hơn so với báo cáo trước đây của Audah và cs. (2022) ($22,7\text{mg QE/g}$ cao khô). Sự khác biệt này có thể là do trong nghiên cứu này đã chiết xuất flavonoid của bột lá dưới sự tác động của sóng siêu âm. Flavonoid là thành phần có mặt trong hầu hết các bộ phận của thực vật nói chung và cây thuốc nói riêng. Flavonoid cùng với các hợp chất hoá học thực vật khác như alkaloid, tannin, phenolic, và saponin góp phần tạo nên hoạt tính sinh học của các chiết xuất từ thực vật, trong đó có khả năng chống oxy hoá.

Cao flavonoid lá bần thể hiện hoạt tính chống oxy hóa ở cả 2 phương pháp thử nghiệm khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS•. Đây là 2 phương pháp được sử dụng phổ biến trong việc đánh giá tiềm năng chống oxy hoá của chiết xuất từ thực vật *in vitro*. Khả năng ức chế DPPH của cao flavonoid lá bần trong nghiên cứu này yếu hơn trong nghiên cứu của (Audah và cs., 2022), tuy nhiên khả năng này cao hơn so với các phân đoạn ethyl acetat, chloroform và carbon tetrachloride lá bần (Bokshi và cs., 2020). Cao flavonoid cũng được chứng minh là có khả năng ức chế ABTS• mạnh gần tương đương với khả năng của Trolox. Hoạt tính chống oxy hoá của cao flavonoid lá bần trong

ngiên cứu này có thể nhận được là do hoạt động của flavonoid (Bag và cs., 2015; Le Hong Luyen, Bui Thanh Tung, & Anh, 2023; Ullah và cs., 2020). Nhiều cấu trúc của flavonoid có thể có trong cao flavonoid lá bần như flavanone, flavone, flavonol hay anthocyanin đều có thể tạo nên khả năng chống oxy hoá này. Bên cạnh khả năng chống oxy hoá, các hợp chất flavonoid còn có hiệu quả trong hỗ trợ hạ đường huyết, kháng viêm, chống ung thư, bảo vệ gan (Liga và cs., 2023).

5. Kết luận

Flavonoid lá bần chua được chiết xuất bằng phương pháp siêu âm có khả năng chống oxy hoá thông qua phản ứng trung hoà gốc tự do DPPH và ABTS. Hàm lượng flavonoid tổng trong cao góp phần giải thích cho khả năng chống oxy hoá phụ thuộc vào nồng độ của cao. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về khả năng hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến mất cân bằng oxy hoá trong cơ thể như đái tháo đường, viêm, ung thư của flavonoid chiết xuất từ lá bần chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Audah, K. A., Ettin, J., Darmadi, J., Azizah, N. N., Anisa, A. S., Hermawan, T. D. F., . . . Batubara, I. (2022). Indonesian Mangrove *Sonneratia caseolaris* Leaves Ethanol Extract Is a Potential Super Antioxidant and Anti Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Drug. *Molecules*, 27(23). doi:10.3390/molecules27238369
- [2] Bag, G. C., Devi, P. G., & Bhaigyabati, T. (2015). Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur Valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 154-159.
- [3] Bakar, F. I. A., Bakar, M. F. A., Hassan, S. H. A., Sanusi, S. B., Kormin, F., Sabran, S. F., & Fuzi, F. Z. M. (2020). Comparison of phytochemicals, antioxidant and anti-cholinesterase activity of unripe and ripe fruit of *Sonneratia caseolaris*. *Food Research*, 4(2), 507-514.
- [4] Bokshi, B., Zilani², M. N. H., Hossain³, H., Ahmed, M. I., Anisuzzman, M., Biswas, N. N., & Sadhu, S. K. (2020). Bioactivities of *Sonneratia Caseolaris* (Linn) leaf and stem using different solvent systems. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 31(5), 24578-24582. doi:DOI: 10.26717/BJSTR.2020.31.005175
- [5] Lê Đức Tuấn, Trần Thị Kiều Oanh, Cát Văn Thành, & Quí, N. Đ. (2002). *Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Nông nghiệp.
- [6] Le Hong Luyen, Bui Thanh Tung, & Anh, N. T. V. (2023). Evaluation of antioxidant activity, total phenolic content, and total flavonoid content of the aerial part of *Canna edulis* Ker Gawl. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 39(4), 64-73. doi:10.25073/2588-1132/vnumps.4553
- [7] Liga, S., Paul, C., & Péter, F. (2023). Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. *12(14)*, 2732.
- [8] Munira, S., Islam, A., Islam, S., Koly, S. F., Nesa, L., & Muhit, A. (2019). Phytochemical screening and comparative antioxidant activities of fractions isolated from *Sonneratia caseolaris* (Linn.) bark extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, 28(4), 1-9.
- [9] Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS•+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674. doi:10.1021/jf0400056

- [10] Ngô Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Thu Phương, Trần Thị Ngân, & Vũ Văn Huy. (2022). Tối ưu hóa quy trình chiết xuất flavonoid từ nụ vối (*Cleistocalyx operculatus* (Roxb) Merr .et Perry, Myrtaceae). *Tap chí Y học Việt Nam, Đặc biệt*, 240-248.
- [11] Nguyễn Công Khanh, & Nguyễn Hoàng Nam. (2022). Stress oxy hoá với bệnh tật. *Tap chí Nhi khoa*, 15(1), 7. doi:<https://doi.org/10.52724/tcnk.v15i1.176>
- [12] Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- [13] Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., . . . Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22). doi:10.3390/molecules25225243