

EFFECT OF EXTRACTION SOLVENT TO TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GUAVA LEAF EXTRACT

Nguyen Thi Nhu Y^{1,2*}, Nguyen Nhu Muoi¹, Huynh Nguyen Thuy Quynh¹, Doan Thi Kieu Tien¹,
Do Thi Tuyen Nhung¹, Nguyen Cuong Quoc², Tran Quang De², Le Thanh Phuoc², Pham Vu Nhat²

¹Can Tho University of Technology, ²Can Tho University

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	12/11/2023	This study investigated the effect of extraction solvent on total polyphenol content and antioxidant activity of Queen guava leaf extract. The leaves were collected in Bac Lieu province, washed, dried and ground to obtain powder as raw material. Two types of solvents, namely ethanol and methanol, were used to extract by maceration method. The obtained products were determined extraction efficiency and total polyphenol content. The results showed that methanol extract acquired higher extraction efficiency and polyphenol content compared to ethanol extract. Methanol extract was selected for the investigation of fraction extracts in three solvents with different polarities: <i>n</i>-hexane, dichloromethane (DC) and ethyl acetate (EA). The antioxidant activity of methanol, <i>n</i>-hexane, DC and EA extracts was identified by DPPH and ABTS assays. The antioxidant activity of total methanol and EA extracts were the best with EC₅₀ values of 15.39 and 12.49 μg/mL, respectively. These results facilitate selecting suitable solvent in developing natural antioxidant products from Queen guava leaf.
Revised:	29/01/2024	
Published:	30/01/2024	
KEYWORDS		
Queen guava		
Guava leaf extract		
Extraction solvent		
Polyphenol content		
Antioxidant activity		

ẢNH HƯỞNG CỦA DUNG MÔI TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HÓA CỦA CAO CHIẾT LÁ ỒI

Nguyễn Thị Như Ý^{1,2*}, Nguyễn Như Muội¹, Huỳnh Nguyễn Thúy Quỳnh¹, Đoàn Thị Kiều Tiên¹,
Đỗ Thị Tuyết Nhung¹, Nguyễn Cường Quốc², Trần Quang Đức², Lê Thanh Phước², Phạm Vũ Nhật²

¹Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ, ²Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT	
Ngày nhận bài: 12/11/2023 Ngày hoàn thiện: 29/01/2024 Ngày đăng: 30/01/2024	Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết lá ổi Nữ hoàng. Lá ổi được thu hái tại Bạc Liêu, rửa sạch, sấy khô và nghiền thu được dạng bột mịn làm nguyên liệu cho quá trình trích ly cao. Hai loại dung môi ethanol và methanol được sử dụng để trích ly cao tổng theo phương pháp ngâm dầm. Sản phẩm cao methanol đạt hiệu suất trích ly và hàm lượng polyphenol tổng cao hơn được lựa chọn cho khảo sát các cao phân đoạn trong ba dung môi với độ phân cực khác nhau là <i>n</i>-hexane, dichloromethane (DC) và ethyl acetate (EA). Hoạt tính kháng oxi hóa được của các cao methanol, <i>n</i>-hexane, DC và EA được khảo sát theo hai phương pháp DPPH và ABTS. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa của cao tổng methanol và cao EA tốt với giá trị EC₅₀ tương ứng là 15,39 và 12,49 µg/mL. Kết quả khảo sát mở ra hướng lựa chọn dung môi phù hợp trong phát triển các sản phẩm kháng oxi hóa tự nhiên từ lá ổi Nữ hoàng.	
TỪ KHÓA		
Ổi nữ hoàng		
Cao chiết lá ổi		
Dung môi trích ly		
Hàm lượng polyphenol		
Hoạt tính kháng oxi hóa		

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9190>

* Corresponding author. Email: ntny@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Ôi nữ hoàng (*Psidium guajava* L.) là một giống ôi được trồng phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long cho mục đích thu quả. Quả ôi được biết đến là một loại quả giàu vitamin C được sử dụng để ăn tươi, ngoài ra còn được chế biến như sấy khô, làm trà, nước ép [1]. Tuy nhiên, ngoài sản phẩm chính là quả, lá ôi cũng là nguyên liệu tự nhiên chứa nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng đái tháo đường, kháng viêm, hỗ trợ điều trị tiêu chảy [2]-[6]. Thành phần chính mang lại hoạt tính kháng oxy hóa cao cho lá ôi được xác định là các hợp chất polyphenol như: gallic acid, ascorbic acid, quercetin, ellagic acid, catechin, morin,... [7]. Lá ôi nữ hoàng là một nguồn sinh khối tái sinh dồi dào tại địa phương có hoạt tính sinh học tiềm năng chưa được khai thác ứng dụng đúng mức và hiệu quả. Khảo sát dung môi phù hợp nhất cho cao chiết lá ôi Nữ hoàng sẽ góp phần tận dụng và nâng cao giá trị nguồn sinh khối tự nhiên này.

Polyphenol là tên gọi chung của một dạng cấu trúc phân tử chứa nhiều nhóm chức phenol. Trong tự nhiên, những hợp chất này thường được tìm thấy ở thực vật bậc cao và có giá trị trong tổng hợp, y học và công nghiệp. Các hợp chất polyphenol ở nhiều loài thực vật đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa, kháng viêm, ngăn ngừa ung thư, chống xơ vữa động mạch [8].

Chất kháng oxy hóa là chất có khả năng làm chậm hoặc ngăn chặn quá trình oxy hóa chất khác bằng cách dập tắt các gốc tự do, hiệu suất dập tắt các gốc tự do phụ thuộc vào mức độ hoạt tính kháng oxy hóa của hợp chất và sự tương thích của hợp chất và loại gốc tự do. Quá trình kháng oxy hóa của các hợp chất phenol diễn ra theo một hoặc nhiều cơ chế: chuyển nguyên tử hydrogen (hydrogen atom transfer - HAT), chuyển một electron - chuyển proton (SETPT- single electron transfer followed by proton transfer), mất proton, chuyển electron (SPLET - sequential proton loss electron transfer),... [9]. Hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát theo một số phương pháp thực nghiệm như trung hòa gốc tự do DPPH[•], khả năng làm sạch gốc tự do ABTS^{•+}, phương pháp năng lực khử sắt,... [10].

Bên cạnh nguồn nguyên liệu với nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, dung môi là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly và hoạt tính sinh học của cao chiết. Về cơ bản, dung môi được lựa chọn để trích ly phải phù hợp trong lĩnh vực sử dụng, phải hoà tan được hợp chất cần khảo sát và có thể loại bỏ được dễ dàng sau khi ly trích. Jongkwon Seo và cộng sự đã nghiên cứu tìm ra dung môi ly trích tốt nhất để sử dụng với lá ôi (*Psidium guajava* L.) cho khả năng kháng oxy hóa chỉ ra rằng hàm lượng polyphenol của cao chiết hydroethanol cao hơn cao chiết nước. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết hydroethanol cao hơn so với cao chiết nước, và cao chiết 50% hydroethanol có hàm lượng polyphenol cao nhất [11]. Dung môi trích ly ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất trích ly và hoạt tính của cao chiết, do đó việc khảo sát loại dung môi phù hợp với nguyên liệu lá ôi nữ hoàng sẽ làm tăng tính kinh tế, tính sinh khả dụng của cao chiết và góp phần định hướng phát triển các sản phẩm kháng oxy hóa tự nhiên từ lá ôi.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Lá ôi nữ hoàng được hái từ Bạc Liêu, rửa sạch, sấy ở 50°C và xay thành bột mịn. Dung môi hữu cơ và hóa chất cơ bản có xuất xứ Việt Nam. DPPH, ABTS, L(+)- Ascorbic acid và thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% xuất xứ Merck, Đức. Các thiết bị gồm tủ sấy EYELA, Nhật Bản; cân sấy ẩm AND MX-50, Nhật Bản; máy cô quay EYELA, Nhật Bản và máy UV-Vis MULTISKAN SKYHIGH, Singapore được sử dụng.

2.2. Quy trình trích ly cao

Độ ẩm bột nguyên liệu được xác định theo phương pháp sấy và được xác định bằng cân sấy ẩm trước khi chiết hai loại cao tổng với dung môi ethanol và methanol bằng phương pháp ngâm dầm ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc, cô quay thu hồi dung môi thu được cao lá ôi. Quá trình chiết được lặp lại đến khi dịch chiết nhạt màu (năm lần). Cao lá ôi

dạng sệt được cân để tính hiệu suất và thử nghiệm định lượng polyphenol và hoạt tính kháng oxy hóa. Hiệu suất trích ly của cao được tính theo công thức (1).

$$H\% = \frac{\text{khối lượng cao chiết}}{\text{khối lượng bột nghiền mịn}} \times 100 \quad (1)$$

2.3. Định lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu [8]. Cụ thể, quy trình thử nghiệm với gallic acid: 1 mL gallic acid, thêm vào 5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Sau 4 phút, thêm 4 mL Na_2CO_3 lắc đều, để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ quang phổ (Abs) ở bước sóng 765 nm. Đối với quy trình thử nghiệm với cao chiết: 1 mL dung dịch cao chiết, thêm vào 5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Sau 4 phút, thêm 4 mL Na_2CO_3 lắc đều, để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng, đo Abs ở bước sóng hấp thụ cực đại 765 nm.

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa theo khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH $^{\bullet}$ của cao chiết lá ổi được thực hiện theo Moharram có hiệu chỉnh [10]. Cụ thể, hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL DPPH $^{\bullet}$ (6×10^{-4} mM) và 1 mL cao chiết ở các nồng độ 1000 ($\mu\text{g/mL}$) pha loãng bậc 2 xuống 12 điểm. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau đó đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH $^{\bullet}$ ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng được sử dụng là L(+)- Ascorbic acid (Ascorbic acid) ở các nồng độ 250 ($\mu\text{g/mL}$) pha loãng bậc 2 xuống 10 điểm. Tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ của DPPH $^{\bullet}$ ở bước sóng 517 nm khi có và không có chất kháng oxy hóa được xác định để tính hiệu suất phản ứng. Hiệu quả kháng oxy hóa 50% (EC_{50}) được dựa vào phương trình đường cong phi tuyến. Hiệu suất trung hòa gốc tự do được tính theo công thức (2).

$$H(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

Ac (Acontrol): giá trị Abs của mẫu chỉ chứa DPPH $^{\bullet}$ và dung môi

As (Asample): giá trị Abs của mẫu chứa DPPH $^{\bullet}$ và các cao chiết hoặc đối chứng.

Hoạt tính kháng oxy hóa theo khả năng loại bỏ gốc tự do ABTS $^{+\bullet}$ thực hiện theo Moharram có hiệu chỉnh [10]. Cụ thể, dung dịch ABTS $^{+\bullet}$ được chuẩn bị bằng cách hòa 2 mL dung dịch ABTS nồng độ 7mM với 2 mL $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ nồng độ 2,45 mM. Ủ dung dịch trong tối 12 giờ, sau đó pha loãng bằng methanol, điều chỉnh độ hấp thụ quang phổ của dung dịch ở bước sóng hấp thụ cực đại 734 nm đến $0,7 \pm 0,02$. Dung dịch đối chứng L(+)- Ascorbic acid nồng độ 1mg/mL và dung dịch các cao chiết methanol, *n*- hexane, DC, EA được pha loãng ở các nồng độ khác nhau bằng methanol. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL ABTS $^{+\bullet}$ và 1 mL dung dịch cao chiết (mẫu cao chiết) hoặc dung dịch đối chứng (chuẩn), được ủ ở nhiệt độ phòng trong 6 phút. Sau đó đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Độ ẩm và hiệu suất trích ly

Độ ẩm bột lá ổi được xác định bằng cân sấy ẩm AND MX-50, đạt $8,71 \pm 0,07\%$, giá trị độ ẩm này khá thấp và phù hợp với tiêu chuẩn bột dược liệu của Dược điển Việt Nam [12] (độ ẩm bột nguyên liệu $<9\%$).

Hiệu suất chiết cao tổng ethanol và methanol tương ứng đạt 16,62% và 18,09%. Cao thu được ở dạng sánh đặc và có màu nâu. Hiệu suất chiết cao phân đoạn được trình bày ở Bảng 1. Theo đó, cao EA đạt hiệu suất cao nhất 10,93%, tiếp theo là cao DC đạt 7,28%, và cao *n*-hexane đạt hiệu suất thấp nhất 6,8%.

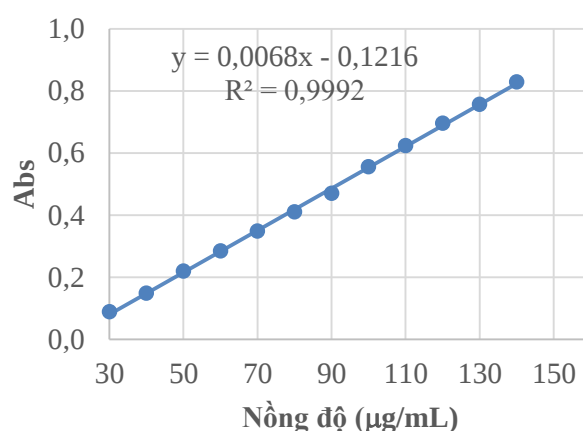
Bảng 1. Hiệu suất trích ly sử dụng dung môi phân đoạn *n*-hexane, DC và EA

Loại cao	Hiệu suất (%)
Cao <i>n</i> -hexane	6,80
Cao DC	7,28
Cao EA	10,93

3.2. Hàm lượng polyphenol tổng

3.2.1. Đường chuẩn gallic acid

Đường chuẩn gallic acid được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 30 đến 140 $\mu\text{g/mL}$ ở bước sóng 765 nm như Hình 1. Kết quả thu được phương trình đường chuẩn gallic acid có dạng $y = 0,0068x - 0,1216$ ($R^2 = 0,9992$).

**Hình 1.** Đường chuẩn gallic acid

3.2.2. Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng polyphenol tổng

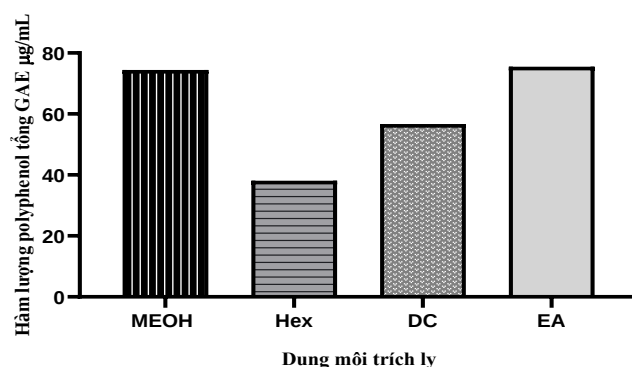
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng polyphenol của cao tổng ethanol và cao tổng methanol được trình bày như Bảng 2. Theo đó, dung môi methanol trích ly được nhiều hợp chất polyphenol hơn. Điều này có thể giải thích các hợp chất polyphenol trong cao chiết lá ổi có nhiều thành phần kém phân cực và dung môi methanol tương thích tốt hơn. Cao methanol được sử dụng để chiết các cao phân đoạn, kết quả được trình bày như Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng polyphenol của các cao chiết lá ổi

Mẫu thử	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng polyphenol tương đương $\mu\text{g/mL}$ gallic acid	Hàm lượng polyphenol (%/g cao)
Cao ethanol	200	$60,17 \pm 0,17$	$30,08 \pm 0,07$
Cao methanol	200	$74,66 \pm 0,24$	$37,33 \pm 0,12$
Cao <i>n</i> -hexane	500	$37,92 \pm 0,14$	$7,58 \pm 0,02$
Cao DC	200	$56,74 \pm 0,22$	$28,37 \pm 0,11$
Cao EA	100	$75,44 \pm 0,15$	$75,44 \pm 0,15$

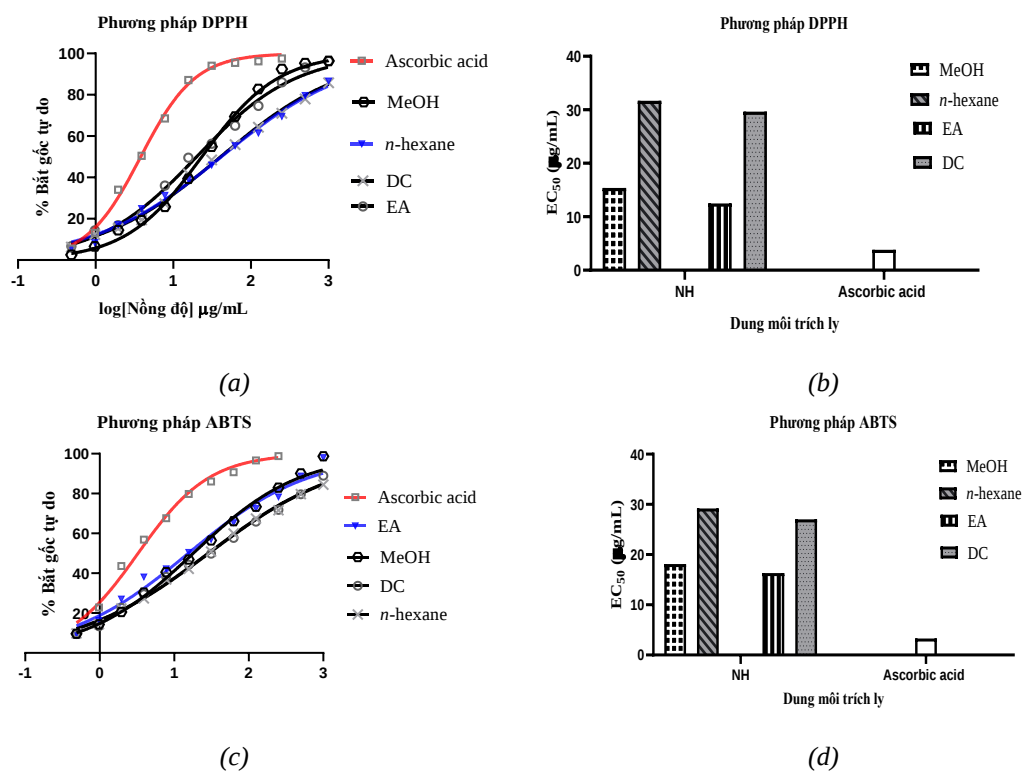
Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng polyphenol của các cao phân đoạn được trình bày như Hình 2. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol trong cao phân đoạn EA và cao tổng methanol cao. Điều này có nghĩa các hợp chất polyphenol trong cao lá ổi chứa các thành phần phân cực không proton nhiều nhất, tan tốt trong dung môi EA và DC, và một lượng ít các hợp chất polyphenol không phân cực tan tốt trong dung môi *n*-hexane. Cụ thể, dung môi EA trích ly

tốt các hợp chất polyphenol tương đương hai lần so với cao phân đoạn *n*-hexane. Điều này hứa hẹn cao phân đoạn EA mang lại hoạt tính tiềm năng trong các thử nghiệm kháng oxy hóa.



Hình 2. Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng polyphenol của cao chiết lá ổi

3.3. Hoạt tính kháng oxy hoá



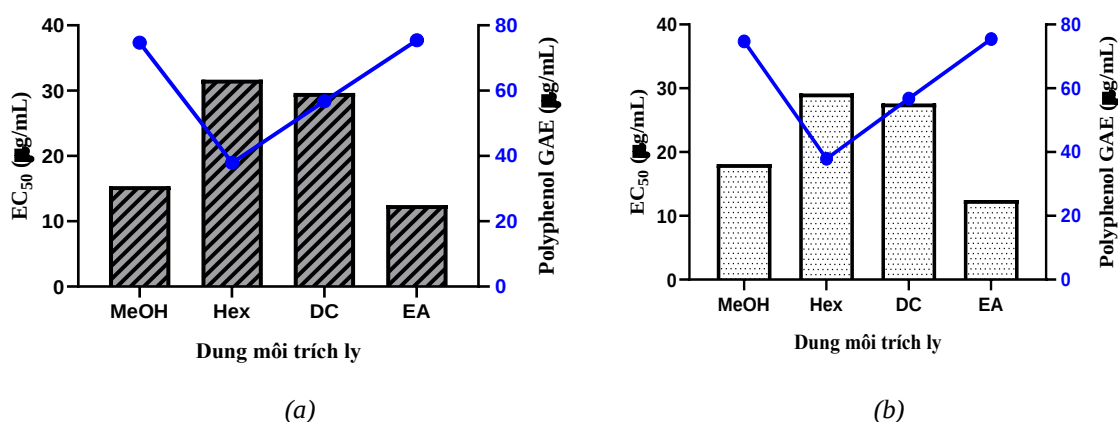
Hình 3. Ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH (a, b) và ABTS (c, d) của các cao chiết lá ổi

Kết quả khảo sát hiệu suất bắt gốc tự do của chuẩn ascorbic acid và cao methanol, cao *n*-hexane, cao DC và cao EA theo cả hai phương pháp DPPH và ABTS được trình bày như Hình 3. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất bắt gốc tự do và khả năng kháng oxy hóa của cao methanol và các cao phân đoạn được so sánh. Theo đó, hiệu suất trung hòa gốc tự do tỉ lệ thuận với nồng độ cao chiết, nồng độ cao chiết càng cao thì khả năng bắt gốc tự do càng lớn và ngược lại. Đặc biệt, cao phân đoạn EA cho thấy hàm lượng polyphenol tương đương gallic acid (GAE) cao nhất với giá trị 75,44 µg/mL. Ngoài ra, khả năng kháng oxy hóa vượt trội của cao EA

theo cả hai phương pháp DPPH và ABTS với giá trị EC_{50} lần lượt là 12,49 và 16,32 $\mu\text{g/mL}$. Cao DC và *n*-hexane có hoạt tính kháng oxi hóa thấp, không phù hợp trích ly cao lá ổi ứng dụng hoạt tính kháng oxi hóa.

3.4. Mối tương quan giữa dung môi trích ly, hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết lá ổi

Mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol và hoạt tính kháng oxi hóa được thể hiện như Hình 4. Cụ thể, hàm lượng polyphenol cao *n*-hexane cao hơn cao EA tuy nhiên hoạt tính kháng oxi hóa của cả hai cao *n*-hexane và DC đều thấp và không có sự chênh lệch đáng kể. Khả năng kháng oxi hóa EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) của cao EA (12,49; 16,32 $\mu\text{g/mL}$) tốt hơn rất nhiều so với cao *n*-hexane (31,67; 29,19 $\mu\text{g/mL}$) và cao DC (29,03; 27,63 $\mu\text{g/mL}$) tương ứng theo hai phương pháp DPPH và ABTS. Kết quả cho thấy dung môi chiết EA rất thích hợp chiết các hợp chất polyphenol có hoạt tính kháng oxi hóa trong lá ổi Nữ hoàng.



Hình 4. Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxi hóa theo phương pháp DPPH (a) và ABTS (b) của các cao chiết lá ổi

4. Kết luận

Nghiên cứu đã khảo sát ảnh hưởng của dung môi trích ly đến hiệu suất trích ly, hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính kháng oxi hóa theo hai phương pháp DPPH và ABTS của hai loại cao tổng (cao ethanol và cao methanol) và 3 loại cao phân đoạn (cao *n*-hexane, cao DC và cao EA). Kết quả cho thấy dung môi methanol và EA phù hợp để sử dụng trích ly cao trong định hướng phát triển các sản phẩm kháng oxi hóa từ cao lá ổi nữ hoàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] R. M. P. Gutiérrez, S. Mitchell, *et al.*, "Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, no. 1, pp. 1-27, 2008.
- [2] J. Ojewole, E. O. Awe, and W. D. H. Chiwororo, "Antidiarrhoeal activity of Psidium guajava Linn, (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rAbsents," *J. Smooth. Muscle. Res.*, vol. 4, no. 6, pp. 195-207, 2008.
- [3] M. S. Banu and K. Sujatha, "Antimicrobial screening of leaf extract of Psidium guajava and its isolated fraction against some pathogenic microorganisms," *Drug Invent Today*, vol. 4, no. 3, pp. 48-50, 2012.
- [4] Q. He and N. Venant, "Antioxidant power of phytochemicals from Psidium guajava leaf," *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, vol. 5, no. 6, pp. 676-683, 2004.
- [5] M. Jang, S. W. Jeong, *et al.*, "Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of guava (Psidium guajava L.) leaves in vitro and in vivo," *Journal of Medicinal foAbs*, vol. 17, no.6, pp. 678-685, 2014.
- [6] C. Denny, P. S. Melo, M. Franchin, *et al.*, "Guava pomace: A new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, pp. 1-7, 2013.
- [7] N. Witayapan, Y. Songwut, and O. Siriporn, "Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract," *FoAbs Science and Technology*, vol. 43, pp. 1095-1103, 2010.

-
- [8] G. Agbor, J. Vinson, and P. E. Donnelly, "Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay," *Int. J. FoAbs Sci. Nutr. Diet.*, no. 11, pp. 147-156, 2014.
- [9] P. V. Nhat, "Antioxidant mechanism of polyphenols," *CTU Journal of Science*, vol. 55, no. 1, pp. 54-58, 2019.
- [10] H. A. Moharram and M. M. Youssef, "MethAbss for Determining the Antioxidant Activity: A Review," *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 31-42, 2014.
- [11] J. Seo, S. Lee, M. L. Elam, *et al.*, "Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy," *Food Science & Nutrition*, vol. 2, no. 2, pp. 174-180, 2014.
- [12] Vietnamese Ministry of Health, *Vietnamese Pharmacopoeia V*; 2017.