

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.056

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CAO PHÂN ĐOẠN SẮC KÝ CỘT SILICA GEL TỪ CAO CHIẾT LÁ CÀ NA (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.)

Phạm Ngọc Cần, Trần Gia Hân, Lê Ngọc Huỳnh Như và Nguyễn Đức Độ*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Đức Độ (email: nddo@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The study was aimed to investigate the antioxidant and antimicrobial ability against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* of fractional extract from the leaves of *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. by silica gel column chromatography. Four fractions are F1 (dichloromethane : ethyl acetate ratio 1 : 1 (v/v)); F2 (acetone : ethyl acetate ratio 9 : 1 (v/v)), F3 (acetone), F4 (methanol). The results of experiment revealed that the highest recovery efficiency in F4 (20.32%). The flavonoid content (211.33 mg QE/g extract) was highest in F1. The total polyphenol content (465.38±2.15 mg GAE/g extract), total tannin (782.80±17.07 mg TAE/g extract) were highest in F2. The highest reduction ability of H₂O₂, Fe³⁺ was in F2 with IC₅₀ values of 20.81±0.06 and 7.40±0.12 (µg/mL), respectively. All fractions were antibacterial (concentration of 100 mg/mL, 24 hrs). The highest antibacterial activity was in F2 with the zones of inhibition *E. coli* (9.8±0.3 mm); *S. aureus* (4.9±0.1 mm); *B. subtilis* (5.8±0.3 mm) (insignificant difference between F1 and F2); *L. acidophilus* (5.8±0.8 mm). MIC values were *E. coli* (0.5 mg/mL), *B. subtilis* (1.0 mg/mL). MBC value was *E. coli* (1.5 mg/mL). The experiment revealed that all fractions are antioxidant and antibacterial activities, of which F2 is most effective.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm mục đích khảo sát khả năng kháng oxy hóa và kháng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* của cao phân đoạn sắc ký cột silica gel từ cao chiết lá cây cà na (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.). Các phân đoạn cao bao gồm: F1 (dichloromethane : ethyl acetate, 1 : 1 (v/v)), F2 (acetone : ethyl acetate, 9 : 1 (v/v)), F3 (acetone), F4 (methanol). Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi cao chiết cao nhất ở phân đoạn F4 (20,32%). Hàm lượng flavonoid (211,33 QE/g cao chiết) cao nhất ở phân đoạn F1. Hàm lượng polyphenol tổng (465,38±2,15 mg GAE/g cao chiết), tannin tổng (782,80±17,07 mg TAE/g cao chiết) cao nhất ở phân đoạn F2. Khả năng khử H₂O₂, Fe³⁺ cao nhất ở phân đoạn F2 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 20,81±0,06 và 7,40±0,12 (µg/mL). Các phân đoạn đều có khả năng kháng khuẩn (nồng độ 100 mg/mL, 24 giờ). Phân đoạn F2 kháng khuẩn cao nhất với đường kính vòng vô khuẩn là: *E. coli* (9,8±0,3 mm); *S. aureus* (4,9±0,1 mm); *B. subtilis* (5,8±0,3 mm) (khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với F1); *L. bacillus* (5,8±0,8 mm). Giá trị MIC: *E. coli* (0,5 mg/mL), *B. subtilis* (1,0 mg/mL). Giá trị MBC: *E. coli* (1,5 mg/mL).

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 29/02/2020

Ngày nhận bài sửa: 22/04/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Antioxidant and antimicrobial activities of *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. leaf extract by silicagel column chromatography fractions

Từ khóa:

Elaeocarpus hygrophilus Kurz., kháng oxy hóa, kháng khuẩn, MIC, sắc ký cột silica gel

Keywords:

Antimicrobial, antioxidant, *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz., MIC, silica gel column chromatography

Trích dẫn: Phạm Ngọc Cần, Trần Gia Hân, Lê Ngọc Huỳnh Như và Nguyễn Đức Độ, 2020. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn của cao phân đoạn sắc ký cột silica gel từ cao chiết lá cà na (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 77-85.

1 GIỚI THIỆU

Việt Nam là một trong những quốc gia có hệ thực vật phong phú hàng đầu trên thế giới với khoảng 12.000 loài khác nhau (Phạm Hoàng Hộ, 2003). Trong hệ thực vật đa dạng tại Việt Nam, cây cà na (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) là loài cây hoang dã, từ lâu đã được người dân sử dụng để làm các món ăn và phòng và trị bệnh. Tuy nhiên, các công bố ở Việt Nam về thành phần và hoạt tính các hợp chất thực vật hiện diện trong loài cây cà na còn khá hạn chế. Vì vậy việc nghiên cứu các hợp chất thực vật và vai trò của chúng có trong loài cây cà na là việc làm có ý nghĩa nhằm ứng dụng loài cây này rộng rãi hơn vào trong cuộc sống, góp phần nâng cao giá trị của một trong số những loài cây đã được xếp vào danh sách “Cây cỏ Việt Nam”.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Hóa chất: Silica gel 60-200 mesh (Ấn Độ), ethanol 96%, methanol 96% (Việt Nam), nước cất, hexane, ethyl acetate, dichloromethane, acetone, Na₂SO₄ khan, dimethyl sulfoxide 100% (DMSO) (Pháp), chloroform, ascorbic acid, H₂O₂ (30%), FeCl₃.6H₂O, Na₂CO₃, AlCl₃.6H₂O, NaH₂PO₄.2H₂O, Na₂HPO₄.12H₂O, CCl₃COOH, K₃[Fe(CN)₆], gallic acid, quercetin, tannic acid, thuốc thử Folin-Ciocalteu, L-cysteins HCl, nước cất, kháng sinh ampicillin (Việt Nam) làm đối chứng dương.

Các dòng vi khuẩn bao gồm: *E. coli* ATCC 10536, *S. aureus* ATCC BAA 1026, *B. subtilis* ATCC 9799, *L. acidophilus* ATCC 700396 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Sinh hóa và Protein Enzyme, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường Lysogeny Broth (LB) dùng để nuôi vi khuẩn.

Mẫu thực vật dùng thử nghiệm: chọn lá bánh tẻ, còn tươi không sâu bệnh từ cây cà na (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.), sau khi thu hái tiến hành rửa sạch và để trong mát cho ráo nước.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chuẩn bị cao phân đoạn sắc ký cột silica gel

Cao phân đoạn điều chế bằng cách dùng 69,8592 (g) cao thô ethanol (CT) từ lá cà na (thu được bằng phương pháp chiết rắn - lỏng kết hợp với đánh sóng siêu âm ở tần số 120 W, trong 60 phút, tỷ lệ mẫu : dung môi là 1 : 5 (w/v)), phân tách bằng sắc ký cột silicagel lần lượt với 4 loại dung môi

dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol theo các tỉ lệ ở các phân đoạn như sau: F1 (dichloromethane : ethyl acetate tỉ lệ 1 : 1 (v/v)); F2 (acetone: ethyl acetate tỉ lệ 9 : 1 (v/v)) và F3 (acetone); F4 (methanol). Pha tĩnh sử dụng silica gel 60-200 mesh, khối lượng sử dụng 400 gram để làm vật liệu nhồi cột.

2.2.2 Khảo sát hàm lượng polyphenol tổng trong cao phân đoạn

Hàm lượng polyphenol tổng được thực hiện theo mô tả của Yadav and Agarwala (2011), có hiệu chỉnh. Lần lượt cho 0,1 mL dung dịch cao chiết nồng độ lần lượt là CT, F1, F3, F4 (0,3 mg/mL) và F2 (0,15 mg/mL) trong methanol và 1 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 10% vào ống nghiệm, ủ ở nhiệt độ 25°C và để phản ứng trong vòng 5 phút. Sau đó thêm vào 1 mL Na₂CO₃ 2%. Sau 45 phút ủ tối ở 25°C, tiến hành ghi nhận độ hấp thụ tại bước sóng 765 nm. Đường chuẩn gallic acid được xác định với quy trình tương tự với dãy nồng độ 20; 40; 60; 80; 100; 120 µg/mL. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Kết quả được thể hiện bằng mg gallic acid (GAE)/g cao chiết.

$$\text{Hàm lượng polyphenol tổng: } C = \frac{c \cdot V}{m}$$

Trong đó, C: hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g cao chiết); c: giá trị x từ đường chuẩn gallic acid (µg/mL); V: thể tích cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.2.3 Khảo sát hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng được thực hiện theo mô tả của Chang *et al.* (2002), có hiệu chỉnh. Hòa tan 0,25 mL dung dịch mẫu nồng độ lần lượt là CT, F3, F4 (2 mg/mL) và F1, F2 (0,5 mg/mL) với 0,75 mL methanol và ủ trong 5 phút. Sau đó thêm tiếp 0,05 mL AlCl₃ 10% để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng hỗn hợp được thêm 0,05 mL CH₃COOK 1 M và 1,4 mL nước khử ion rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 415 nm. Đường chuẩn quercetin được xác định với quy trình tương tự với dãy nồng độ 20; 40; 60; 80; 100; 120 µg/mL. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Kết quả được thể hiện bằng mg quercetin (QE)/g cao chiết.

$$\text{Hàm lượng flavonoid tổng: } F = \frac{c \cdot V}{m}$$

Trong đó, F: hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g cao chiết); c: giá trị x từ đường chuẩn với quercetin (µg/mL); V: thể tích cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong V(g).

2.2.4 Khảo sát hàm lượng tannin tổng

Hàm lượng tannin được thực hiện theo mô tả của Laitonjam *et al.* (2013), có hiệu chỉnh. Lần lượt cho 0,25 mL dung dịch cao chiết nồng độ lần lượt là F3, F4 (0,1 mg/mL), CT (0,2 mg/mL), F1 (0,5 mg/mL) và F2 (0,05 mg/mL); 0,25 mL nước khử ion; 0,25 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 20% vào ống nghiệm, ủ ở nhiệt độ phòng và để phản ứng trong vòng 5 phút. Sau đó, thêm vào 1 mL Na₂CO₃ 20%. Sau 30 phút ủ trong tối, tiến hành ghi nhận độ hấp thụ tại bước sóng 700 nm. Đường chuẩn tannic acid được xác định với quy trình tương tự với dãy nồng độ 20; 40; 60; 80; 100; 120 µg/mL. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Kết quả được thể hiện bằng mg tannic acid (TAE)/g cao chiết.

$$\text{Hàm lượng tannin tổng: } C = \frac{c \cdot V}{m}$$

Trong đó, C: hàm lượng tannin tổng (mg tannic acid/g cao chiết); c: giá trị x từ đường chuẩn với tannic acid (µg/mL); V: thể tích cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

2.2.5 Khảo sát khả năng khử H₂O₂ của cao phân đoạn

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Sharma and Kumar *et al.* (2011), có hiệu chỉnh. Lần lượt cho 0,5 mL cao chiết với nồng độ lần lượt là CT (20, 40, 60, 80 µg/mL), F1 (80, 130, 180, 230 µg/mL), F2 (10, 15, 20, 25 µg/mL), F3 (0, 20, 40, 60 µg/mL), F4 (0, 40, 60, 80 µg/mL) và 2,5 mL H₂O₂ vào mỗi ống nghiệm. Sau đó, để 10 phút ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C). Cuối cùng, tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 230 nm. Mẫu trắng là mẫu không chứa cao và vitamin C. Đường chuẩn vitamin C được xác định với quy trình tương tự với dãy nồng độ 80; 100; 120; 140; 160; 180 µg/mL. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại.

$$\% \text{ Ức chế H}_2\text{O}_2 = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

Trong đó, A₀: độ hấp thụ của mẫu trắng (không chứa vitamin C); A: độ hấp thụ của mẫu cao hoặc vitamin C.

2.2.6 Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết phân đoạn lá cây cà na bằng khả năng khử ion Fe³⁺

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Singhal *et al.* (2014) có hiệu chỉnh. Lần lượt cho 90 µL cao chiết với nồng độ lần lượt là CT (7 - 14 µg/mL), F1 (35 - 47 µg/mL), F2 (4 - 11 µg/mL), F3 (8 - 15 µg/mL), F4 (12 - 27 µg/mL) vào ống nghiệm có chứa 225 µL dung dịch đệm phosphate 0,2 M (pH

6,6) và 225 µL dung dịch kali ferricyanid 1%. Ủ dung dịch trên ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, mỗi ống nghiệm được bổ sung thêm 225 µL dung dịch acid trichloroacetic 10%. Thêm vào 2125 µL nước khử ion và 125 µL dung dịch ferric chloride 0,1%. Xác định độ hấp thụ bằng máy quang phổ ở bước sóng 700 nm. Đường chuẩn vitamin C được xác định với quy trình tương tự với dãy nồng độ 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 µg/mL. Mẫu trắng được thay thế cao chiết bằng nước khử ion.

$$\text{Khả năng khử (\%)} = \frac{A - A_0}{A_0} * 100$$

Trong đó: A là độ hấp thụ của mẫu cao hoặc vitamin C; A₀ là độ hấp thụ của mẫu trắng.

2.2.7 Khảo sát hiệu quả ức chế vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch

Huyền phù vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* và *L. acidophilus* được nuôi cấy trong môi trường LB, ủ ở 37°C, 24 giờ, sau đó tạo dịch huyền phù đạt mật số tương đương 10⁶ CFU/mL. Cao chiết mỗi loại được pha loãng trong dimethyl sulfoxide (DMSO) 100% để đạt nồng độ 100 mg/mL. Đối chứng dương: Ampicillin 0,005 mg/mL (đối với khảo sát *B. subtilis*), Ampicillin 0,01 mg/mL (đối với khảo sát *L. acidophilus*), Ampicillin 0,5 mg/mL (đối với khảo sát *E. coli* và *S. aureus*) được pha loãng bằng nước cất. Đối chứng âm: DMSO 100%. Kết quả được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK).

2.2.8 Khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) dựa trên phương pháp nghiên cứu của Ruangpan and Tendencia (2004) có hiệu chỉnh.

Pha loãng cao phân đoạn trong DMSO 100% để đạt được dãy nồng độ khảo sát. Tạo huyền phù vi khuẩn đạt mật số tương đương 10⁶ CFU/mL (xác định lại mật số chính xác bằng phương pháp pha loãng huyền phù và trải đĩa đếm khuẩn lạc sống). Hút 200 µL môi trường LB lỏng cho vào mỗi tube Eppendorf, bổ sung thêm 250 µL dịch huyền phù vi khuẩn, bơm 50 µL cao chiết ở mỗi nồng độ khác nhau, ủ các tube mẫu ở 37°C trong 24 giờ. Đối chứng âm là DMSO 100%.

Tiến hành đếm mật số vi khuẩn ở mỗi nồng độ khảo sát bằng phương pháp pha loãng mẫu và trải đếm trên môi trường đĩa thạch.

2.2.9 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, phân tích thống kê bằng chương trình Minitab 16.0, phân tích ANOVA và các giá trị trung bình được so sánh bằng kiểm định Tukey.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả điều chế cao phân đoạn

Từ cao thô lá cà na mang đi sắc ký cột với các dung môi có độ phân cực tăng dần dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol thu được khối lượng cao ở mỗi phân đoạn (Bảng 1).

Bảng 1: Hiệu suất điều chế cao phân đoạn lá cà na bằng phương pháp sắc ký cột

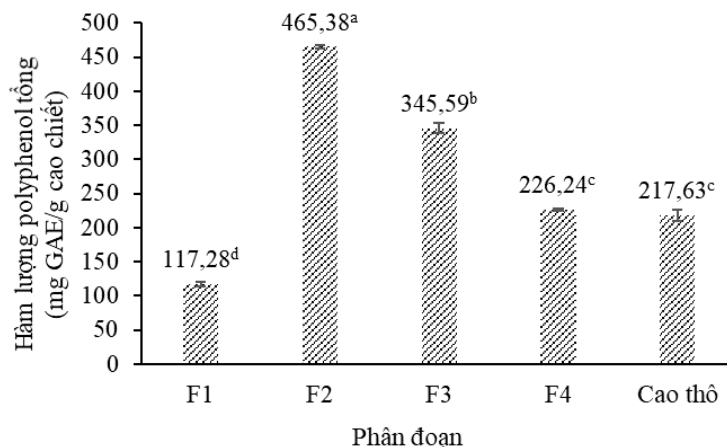
| Phân đoạn | Khối lượng cao (gram) | Hiệu suất ly trích (%) |
|-----------|-----------------------|------------------------|
| F1 | 4,1636 | 5,96 |
| F2 | 6,6060 | 9,46 |
| F3 | 11,6551 | 16,68 |
| F4 | 14,1982 | 20,32 |

Phân đoạn F4 ly trích trong dung môi methanol thu được 14,1982 g có hiệu suất cao nhất (20,32%)

và phân đoạn F1 thu được 4,1636 g có hiệu suất thấp nhất (5,96%). Hiệu suất thu hồi cao tại các phân đoạn phụ thuộc vào độ phân cực của các hợp chất thực vật hiện diện trong hỗn hợp cao chiết và độ phân cực của dung môi dùng chiết cao. Các dung môi có độ phân cực cao và trung bình như methanol và acetone cho hiệu suất thu hồi cao các hợp chất thực vật có độ phân cực, ngược lại cho hiệu suất thu hồi thấp các hợp chất thực vật có độ phân cực kém hoặc không phân cực. Các dung môi có độ phân cực kém như dichloromethane và ethyl acetate thì ngược lại. Dung môi methanol thu hồi các hợp chất như chlorophyll, saponin, các acid hữu cơ, tannin, polysaccharide. Dung môi ethyl acetate thu hồi các hợp chất như: sesquiterpen, diterpen, coumarin, quinone, các aglycol, một số alkaloid có tính kiềm yếu (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Có thể do hàm lượng các hợp chất thực vật có tính phân cực hiện diện nhiều trong lá cà na nên F3, F4 cho hiệu suất thu hồi cao chiết tốt hơn so với F1 và F2.

3.2 Kết quả định lượng polyphenol tổng trong cao phân đoạn

Dựa vào phương trình đường chuẩn gallic acid ($y = 0,0031x - 0,0094$ với $R^2 = 0,9996$) để xác định hàm lượng polyphenol tổng trong các phân đoạn.



Hình 1: Hàm lượng polyphenol tổng có trong cao thô và các cao phân đoạn lá cà na

Ghi chú: Hàm lượng polyphenol tổng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Giữa các phân đoạn, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (*) qua kiểm định Tukey.

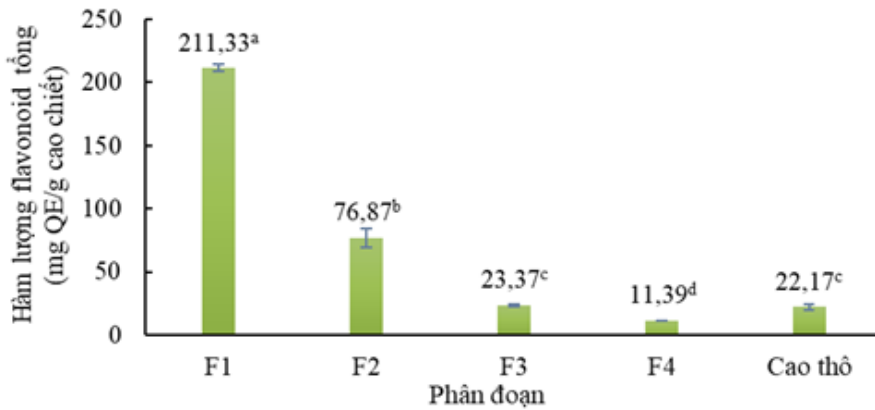
Nhìn chung, tất cả các phân đoạn cao chiết đều chứa các hợp chất polyphenol. Phân đoạn có hàm lượng polyphenol tổng cao nhất là F2 (465,38 mg GAE/g cao chiết) và F1 có hàm lượng polyphenol tổng thấp nhất (117,28 mg GAE/g cao chiết). Phân đoạn F2 được ly trích trong dung môi acetone là dung môi có độ phân cực trung bình. Những hợp chất polyphenol tự nhiên thích hợp hòa tan trong các dung môi có độ phân cực trung bình như alcohol và

acetone hơn dung môi có độ phân cực mạnh (nước), và phân cực thấp (ethyl acetate) (Galanakis *et al.*, 2013). Ngoài ra, ở các phân đoạn khác vẫn chứa hàm lượng polyphenol nhất định do một số phân tử polyphenol có nhóm chức phân cực cao hoặc ít phân cực có thể hòa tan được trong dung môi phân cực cao như methanol hoặc ít phân cực như chloroform và ethyl acetate (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

3.3 Kết quả khảo sát hàm lượng flavonoid tổng

Dựa vào phương trình đường chuẩn của quercetin ($y = 0,0053x + 0,0103$ với $R^2 = 0,9979$) để

xác định hàm lượng flavonoid tổng trong các phân đoạn.



Hình 2: Hàm lượng flavonoid tổng có trong cao thô và các cao phân đoạn lá cà na

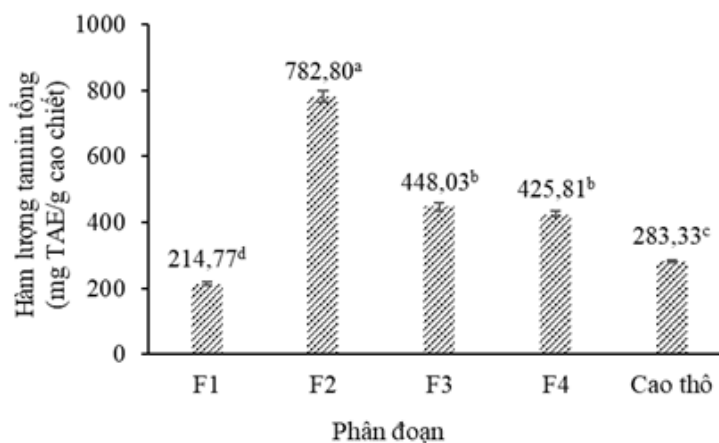
Ghi chú: Hàm lượng flavonoid tổng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Giữa các phân đoạn, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (*) qua kiểm định Tukey.

Phân đoạn F1 với 211,33 mg QE/g cao chiết có hàm lượng flavonoid tổng cao nhất. Tiếp theo là phân đoạn F2 (76,87 mg QE/g cao chiết), F3 (23,37 mg QE/g cao chiết) khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với cao thô (22,17 mg QE/g cao chiết) và ít nhất là phân đoạn F4 (11,39 mg QE/g cao chiết). Quercetin thuộc nhóm flavonol ít phân cực hiện diện trong *Elaeocarpus ganitrus* (chi Côm) (Swati *et al.*, 2012). Có thể trong cà na cũng chứa nhiều flavonoid ít phân cực hòa tan tốt trong dichloromethane và ethyl acetate nên phân đoạn F1 cho kết quả hàm lượng flavonoid tổng cao nhất trong các phân đoạn. Trong nhóm flavonoid ngoài

các hợp chất ít phân cực thì còn chứa nhóm hợp chất phân cực. Chẳng hạn cùng là flavon nhưng có thể có tính phân cực mạnh hoặc trung bình tùy vào số lượng và tính phân cực của các nhóm chức (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Điều này giải thích tại sao các phân đoạn có tính phân cực cao và trung bình như F3, F4 vẫn chứa hàm lượng flavonoid tổng nhất định.

3.4 Khảo sát hàm lượng tannin tổng

Dựa vào phương trình đường chuẩn của tannic acid ($y = 0,0093x + 0,026$ với $R^2 = 0,9992$) để xác định hàm lượng tannin tổng trong từng phân đoạn.



Hình 3: Hàm lượng tannin tổng có trong cao thô và các cao phân đoạn lá cây cà na

Ghi chú: Hàm lượng tannin tổng là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Giữa các phân đoạn, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% (*) qua kiểm định Tukey.

Phân đoạn F2 cho hàm lượng tannin tổng nhiều nhất (782,80 mg TAE/g cao chiết), thấp nhất là phân đoạn F1 với hàm lượng tannin tổng là 214,77 mg TAE/g cao chiết. Hàm lượng tannin tổng khi sử dụng các dung môi có độ phân cực tăng dần theo thứ tự: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, acetone, methanol và nước để ly trích lá *Terminalia chebula* Retz. (họ trám bầu) cho kết quả cao chiết acetone có hàm lượng tannin tổng cao nhất (109,78 mg TAE/g cao chiết), cao hơn cả dung môi nước và methanol (Kathirvel and Sujatha, 2012). Điều này chứng tỏ acetone là dung môi có độ phân cực phù hợp để ly trích tannin hiệu quả nhất. Có sự chênh lệch hàm lượng tannin tổng giữa F2 và F3 khi sử dụng cùng một loại dung môi acetone. Bởi vì cấu trúc hóa học của tannin chứa cả phân phân cực (ưa nước) và không phân cực (kỵ nước), nhóm hydroxyl là phần phân cực còn cấu trúc vòng thơm polyphenol là không phân cực, nên để trích xuất được tannin hiệu quả nhất, cần phải phối trộn giữa dung môi ít phân cực và phân cực. F2 là phân đoạn với dung môi acetone là chính, vì thế dung môi ít phân cực ở cuối phân đoạn F1 có thể còn lưu lại ở đầu phân đoạn F2, tạo nên sự kết hợp giữa dung môi phân cực và ít phân cực, từ đó phân đoạn F2 ly trích được nhiều tannin hơn F3.

3.5 Khảo sát khả năng khử H₂O₂ của cao phân đoạn

Dựa trên các phương trình đường chuẩn của vitamin C ($y = 0,4313x - 1,7956$ với $R^2 = 0,9778$), cao thô ($y = 0,5568 + 24,531$ với $R^2 = 0,9519$), F1 ($y = 0,1555x + 32,108$ với $R^2 = 0,9712$), F2 ($y = 1,8041x + 12,467$ với $R^2 = 0,9611$), F3 ($y = 0,6241x + 35,414$ với $R^2 = 0,9671$), F4 ($y = 1,0033x + 18,158$ với $R^2 = 0,9608$) để xác định các giá trị IC₅₀ cho từng phân đoạn (Bảng 2).

Phân đoạn F2 (phân tách trong acetone : ethyl acetate, 9 : 1) cho khả năng khử H₂O₂ mạnh nhất với giá trị IC₅₀ là 20,81 µg/mL, kháng yếu nhất là F1 (115,00 µg/mL). Sunil Kumar *et al.* (2015) đã nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của cao chiết lá cây rau muối (*Chenopodium album*) trong dung môi methanol và ethyl acetate cho thấy phân đoạn methanol khử mạnh gấp 1,7 lần so với phân đoạn ethyl acetate. Loại dung môi và độ phân cực có thể ảnh hưởng đến sự chuyển điện tử đơn và chuyển nguyên tử hydro, là những khía cạnh quan trọng trong việc xác định khả năng kháng oxy hóa (Calixto and Jimenez, 2018). Từ những dữ liệu trên đã chứng minh được sự ảnh hưởng rất lớn của dung môi, ở những phân đoạn được ly trích bằng những dung môi khác nhau sẽ cho khả năng kháng oxy hóa khác

nau phụ thuộc vào hàm lượng của từng hợp chất có trong mẫu thực vật. Các hợp chất kháng oxy hóa như polyphenol đã được báo cáo là làm giảm các gốc tự do bằng cách nhường một nguyên tử hydro hoặc electron cho gốc tự do, thúc đẩy quá trình chuyển H₂O₂ thành nước (Wettasinghe and Shahidi, 1999).

3.6 Kết quả khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết phân đoạn lá cây cà na bằng khả năng khử ion Fe³⁺

Dựa trên các phương trình đường chuẩn của vitamin C ($y = 22,619x - 7,3413$ với $R^2 = 0,9873$), cao thô ($y = 12,283x + 77,27$ với $R^2 = 0,998$), F1 ($y = 4,3217x - 114,7$ với $R^2 = 0,9892$), F2 ($y = 13,619x - 50,754$ với $R^2 = 0,9804$), F3 ($y = 7,829x - 43,84$ với $R^2 = 0,9912$), F4 ($y = 7,412x - 79,295$ với $R^2 = 0,9825$) để xác định các giá trị IC₅₀ cho từng phân đoạn.

Bảng 2: Giá trị IC₅₀ của vitamin C, cao thô và các phân đoạn cao chiết lá cà na trong thí nghiệm kháng oxy hóa khử H₂O₂ và khử ion Fe³⁺

| Phân đoạn | Nồng độ ức chế 50 % (IC ₅₀ , µg/mL) ** | |
|-----------|---|-------------------------|
| | Khử H ₂ O ₂ | Khử Fe ³⁺ |
| Vitamin C | 120,10±0,55 ^a | 2,53±0,23 ^e |
| F1 | 115,00±1,79 ^b | 38,13±0,97 ^a |
| F2 | 20,81±0,06 ^c | 7,40±0,12 ^d |
| F3 | 23,37±0,24 ^e | 12,00±0,68 ^c |
| F4 | 31,74±0,13 ^d | 17,44±0,18 ^b |
| Cao thô | 45,73±0,60 ^c | 10,34±0,47 ^c |

Ghi chú: Giá trị IC₅₀ là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mức ý nghĩa 1% (**) qua kiểm định Tukey.

Từ kết quả thí nghiệm, tất cả các phân đoạn đều có năng lực khử ion Fe³⁺ với giá trị IC₅₀ dao động từ 2,53 µg/mL đến 38,13 µg/mL. Phân đoạn F2 cho khả năng khử ion Fe³⁺ mạnh nhất (IC₅₀ tương ứng là 7,40 µg/mL), yếu nhất là phân đoạn F1 (38,13 µg/mL). Cao chiết acetone của cây *Lepidagathis keralensis* (họ ô rô) cho khả năng khử Fe³⁺ cao hơn cả cao chiết nước, methanol và petroleum ether (Leena *et al.*, 2017). Độ phân cực của dung môi được sử dụng để ly trích sẽ ảnh hưởng đến khả năng khử ion Fe³⁺ của của cao chiết thực vật và dung môi acetone đã được chứng minh là có hiệu quả nhất. Khả năng khử ion Fe³⁺ của các phân đoạn cao chiết lá cà na còn chịu ảnh hưởng từ các nhóm chất polyphenol, tannin. Sự hiện diện của chất kháng oxy hóa sẽ dẫn đến việc khử ion Fe³⁺ thành Fe²⁺ bằng cách nhường điện tử (Prihantini *et al.*, 2015). Khả

năng kháng oxy hóa dựa trên việc phá vỡ chuỗi gốc tự do bằng cách cho nguyên tử hydro. Polyphenol đóng vai trò là chất khử bằng cách nhường các electron và phản ứng với các gốc tự do để chuyển chúng thành các chất ổn định hơn và chấm dứt chuỗi phản ứng, phá vỡ chu kỳ tạo ra các gốc mới (Loganayaki *et al.*, 2011). Tính khử của tannin có đặc và thủy phân (ellagitannin) có trọng lượng phân tử lớn có thể cao hơn từ mười lăm đến ba mươi lần so với các hợp chất polyphenol đơn giản (Yokozawa *et al.*, 1998). Do đó, hợp chất polyphenol, tannin của cao chiết thực vật có chức năng như là nguồn electron và hydro nguyên tử để có thể khử các gốc tự do.

3.7 Kết quả khảo sát hiệu quả ức chế vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*

Nhìn chung các phân đoạn cao phân đoạn lá cây cà na đều cho hiệu quả kháng *L. acidophilus*, *B.*

subtilis, *S. aureus* và *E. coli*. Trong đó, hiệu quả kháng *E. coli* cao hơn so với *L. acidophilus*, *B. subtilis*, và *S. aureus*. Phân đoạn F2 cho hiệu quả ức chế mạnh nhất trong các phân đoạn đối với 4 dòng vi khuẩn *L. acidophilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*. và *E. coli* với giá trị ĐKVVK lần lượt là 5,8±0,8 mm, 5,8±0,3 mm, 4,9±0,1 mm và 9,8±0,3 mm, trong đó khả năng ức chế *E. coli* cao nhất so với các vi khuẩn khác. Điều này có thể do thành tế bào của vi khuẩn Gram âm và Gram dương là khác nhau. Ở vi khuẩn Gram dương, thành tế bào bao gồm một lớp peptidoglycan và lipoteichoic acid dày không có màng ngoài, ngược lại vi khuẩn Gram âm có lớp peptidoglycan mỏng và có màng ngoài (Brown *et al.*, 2015). Điều này cho thấy sự khác biệt rất rõ về màng tế bào của hai nhóm vi khuẩn. Các hợp chất tự nhiên trong phân đoạn F2 có khả năng chứa các gốc hóa học có khả năng cố định màng tế bào, các kênh tín hiệu và sự trao đổi chất của các vi khuẩn gram âm như *E. coli* nên cho hiệu quả vượt trội như trên.

Bảng 3: Giá trị ĐKVVK giữa 5 phân đoạn cao chiết với 4 dòng vi khuẩn, ở nồng độ 100 mg/mL, *L. acidophilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*. và *E. coli* ở nồng độ 100 mg/mL

| Vi khuẩn | Đường kính vòng vô khuẩn (mm) của các loại cao chiết | | | | |
|-----------------------|--|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | CT* | F1* | F2* | F3* | F4* |
| <i>L. acidophilus</i> | 4,8±0,3 ^b | 3,5±0,3 ^b | 5,8±0,8 ^b | 4,7±0,4 ^b | 0,0±0,0 ^c |
| <i>B. subtilis</i> | 2,3±0,6 ^c | 6,0±1,3 ^a | 5,8±0,3 ^b | 4,3±0,3 ^b | 1,1±0,1 ^b |
| <i>S. aureus</i> | 0,0±0,0 ^d | 1,7±0,3 ^c | 4,9±0,1 ^b | 0,0±0,0 ^c | 0,0±0,0 ^c |
| <i>E. coli</i> | 7,8±0,6 ^a | 4,4±0,2 ^{ab} | 9,8±0,3 ^a | 8,6±0,5 ^a | 7,1±0,2 ^a |

Ghi chú: Giá trị ĐKVVK là giá trị trung bình với 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% (*) qua kiểm định Tukey. Đối chứng âm - DMSO 100% cho ĐKVVK bằng 0.

3.8 Kết quả khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Theo kết quả của thí nghiệm xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của phân đoạn F2 đối với vi khuẩn *B. subtilis* là 1 mg/mL với phần trăm ức chế 97,76% và chưa tìm được nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). Cao chiết bột khô của lá cây *Elaeocarpus sphaericus* (cây cùng chi với cây cà na) trong dung môi acetone cho khả năng kháng *B. subtilis* với giá trị MIC tại nồng độ 0,125 mg/mL (Singh and Gopal, 1999). Cao chiết bột khô của lá cây *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. (cây cùng chi với cây cà na) trong dung môi nước cho khả năng kháng *Bacillus cereus* với giá trị MIC tại nồng độ 0,125 mg/mL (Kumar and Kokati, 2011). Sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* phụ thuộc vào dãy nồng độ của phân đoạn cao phân đoạn F2. Khi tăng nồng độ của cao chiết thì hiệu quả ức chế *B. subtilis* càng tăng.

Nguyên nhân chưa tìm được giá trị MBC có thể là do nồng độ chất trong cao chiết và liên quan khả năng tổng hợp màng sinh học của *B. subtilis* (Boakye *et al.*, 2019).

Bảng 4: Giá trị MIC và MBC của phân đoạn F2 đối với vi khuẩn *B. subtilis*.

| Nồng độ (mg/mL) | Mật số vi khuẩn (CFU/mL) | Phần trăm ức chế (%) | MIC/ MBC |
|-----------------|--------------------------|----------------------|----------|
| 1 | 1,7×10 ⁶ | 97,76% | MIC |
| 2 | 2,5×10 ⁵ | 99,67% | MIC |
| 4 | 8,0×10 ³ | 99,99% | MIC |
| 6 | 7,7×10 ³ | 99,99% | MIC |
| 8 | 6,2×10 ³ | 99,99% | MIC |
| Đối chứng | | 7,6×10 ⁷ | |

Theo kết quả của thí nghiệm xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của phân đoạn F2 đối với vi khuẩn *E. coli* là 0,5 mg/mL với phần trăm ức chế 97,18% và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) tại nồng độ 1,5 mg/mL. Cao chiết bột khô của lá cây *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. trong dung môi nước

cho khả năng kháng *E. coli* với giá trị MIC tại nồng độ 0,5 mg/mL (Kumar and Kokati, 2011). Cao chiết bột khô *Elaeocarpus serratus* trong dung môi ethanol cho khả năng kháng *E. coli* với giá trị MIC tại nồng độ 1,3 mg/mL và giá trị MBC tại 2 mg/mL (Fernando *et al.*, 2018). Các kết quả trên cho thấy khả năng kháng *E. coli* của cao chiết lá cà na trong dung môi acetone tương đương với các nghiên cứu gần đây thuộc chi *Elaeocarpus*.

Bảng 5: Giá trị MIC và MBC của phân đoạn F2 đối với vi khuẩn *E. coli*

| Nồng độ | Mật số vi khuẩn (CFU/mL) | Phần trăm ức chế (%) | MIC/MBC |
|-----------|--------------------------|----------------------|---------|
| 0,5 | 4,8*10 ⁵ | 97,18 | MIC |
| 1,0 | 1,3*10 ⁴ | 99,92 | MIC |
| 1,5 | 0,0 | 100,00 | MBC |
| Đối chứng | 1,7*10 ⁷ | 0 | - |

4 KẾT LUẬN

Qua kết quả thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn của cao phân đoạn chiết xuất từ lá cà na bằng sắc ký cột silicagel, ở các phân đoạn cao chiết đều có khả năng kháng oxy hóa và kháng các loài vi khuẩn khảo sát với mức độ khác nhau tùy theo độ phân cực của dung môi dùng để chiết cao. Trong đó phân đoạn cao chiết bằng dung môi acetone (F2) cho hiệu quả kháng oxy hóa qua khả năng khử Fe³⁺ và H₂O₂, cũng như khả năng kháng các loài vi khuẩn *E. coli*, *B. subtilis*, *L. acidophilus*, *S. aureus* cao hơn so với các phân đoạn khác. Đây là cơ sở để nghiên cứu sâu hơn các thành phần hợp chất có hoạt tính sinh học trong phân đoạn F2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Boakye, Y.D., Newman O., Cynthia A.D., Francis A. and Christian A., 2019. Antimicrobial Agents: Antibacterial Agents, Anti-biofilm Agents, Antibacterial Natural Compounds, and Antibacterial Chemicals. IntechOpen. London, 1-25.

Calixto, F.S., and Jimenez J.P., 2018. Non extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health. Royal Society of Chemistry. London, 399 pages.

Chang, C.C., Yang M.H., Wen H.M. and Chern J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10(3): 178-182.

Fernando, F.L., Caroline A. B., Claudia A.L.C., Marta C.T.D. and Eliana J.S.A., 2018. Evaluation of nutritional composition, bioactive compounds and antimicrobial activity of

Elaeocarpus serratus fruit extract. African Journal of Food Science. 3(1): 30-37.

Galanakis, C.M., Goulas V., Tsakona S., Manganaris G.A. and Gekas V., 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. International Journal of Food Properties. 16(2): 382-396.

Kathirvel, A. and Sujatha V., 2012. In vitro assessment of antioxidant and antibacterial properties of *Terminalia chebula* Retz. Leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(2): 788-795.

Kumar, L.K. and Kokati V.B.R., 2011. Antimicrobial activity of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. (*Elaeocarpaceae*): An in vitro study. Bio Technology. 40: 5384-5387.

Laitonjam, W.S., Yumnam R., Asem S.D. and Wangkheirakpam S.D., 2013. Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T. Anderson and *Phlocanthus jenkinicii* C.B. Clarke leaves. Indian Journal of Natural Products and Resources. 4(1): 67-72.

Leena, P., Zeinul H.N.H. and Jisha M., 2017. Antioxidant activities and chemical composition of various crude extracts of *Lepidagathis keralensis*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 7(06): 182-189.

Loganayaki, N., Siddhuraju P. and Manian S., 2011. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. J Food Sci Technol. 50(4): 687-695.

Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập các hợp chất hữu cơ. Nxb Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. 20-25.

Phạm Hoàng Hộ, 2003. Cây cỏ Việt Nam. Nxb Trẻ. Quyển I, trang 470.

Ruangpan, L. and Tendencia E. A., 2004. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. 37: 31-45.

Sharma D., Kumar N., Bhardwaj VK. and Vaid S., 2013. Effect of hydrogen peroxide mouthwash as an adjunct to chlorhexidine on stains and plaque. J. Indian Soc Periodontol. 17: 449-453.

Singhal, M., Paul A. and Singh H. P., 2014. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. Journal of Saudi Chemical Society. 18(2): 121-127.

Singh, R.K. and Gopal N., 1999. Antimicrobial activity of *Elaeocarpus sphaericus*. Phytotherapy research. 13(5): 448-450.

- Swati, J., Payal G., Navin K., Nishant R., Pankaj G. and Ashish T., 2012. A comprehensive report on therapeutic potential of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb. (Rudraksha). Environment Conservation Journal, 13(3): 147-150.
- Wettasinghe, M. and Shahidi F., 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. Food chemistry. 67(4): 399-414.
- Yadav, R.N.S and Agarwala M., 2011. Phytochemical Analysis of Some Medical Plants. Journal of Phytology. 3: 10-14.
- Yokozawa, T., Chen C.P., Dong E., Tanak T., Nonaka, G.I. and Nishioka I., 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Biochemical Pharmacology, 56(2): 213-222.