

XÁC ĐỊNH TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA VITAMIN C VÀ MỘT SỐ CAO ETHANOL THÔ CHIẾT TỪ THỰC VẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP FERRIC THIOCYANATE (FTC)

Trần Thị Bé Lan và Lê Thanh Phước¹

ABSTRACT

Crude ethanolic extracts of cork-root bark, fig-haulm bark, and areca seed were used to determine antioxidation activity by Ferric Thiocyanate Method (FTC), and ascorbic acid was used as a standard agent. The results show that the antioxidation activity of ascorbic acid is $(88.09 \pm 0.27) \%$, cork-root bark crude ethanolic extract is $(41.99 \pm 0.07) \%$, fig-haulm bark crude ethanolic extract is $(36.65 \pm 0.07) \%$, and areca seed crude ethanolic extract is $(79.16 \pm 0.13) \%$. Comparing the obtained result with the antioxidation activity of vitamin C and standard ascorbic acid reveals the deviation of $+8.37 \%$. Antioxidation activity results using DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) method show that the antioxidation activity percent of ascorbic acid, cork-root, fig-haulm, and areca seed crude ethanolic extracts in DPPH system by different SC50 values ($\mu\text{g/mL}$) are $(91.0 \pm 0.3) \%$ by $9.37 (\mu\text{g/mL})$, $(77.9 \pm 0.3) \%$ by $32.28 (\mu\text{g/mL})$, $(82.9 \pm 0.3) \%$ by $27.3 (\mu\text{g/mL})$, and $(89.9 \pm 0.2) \%$ by $25.83 (\mu\text{g/mL})$, respectively. Compared to the DPPH method, the results from FTC method indicate that the deviation of ascorbic acid is $+2.06 \%$, cork-root bark is $+25.09 \%$, fig-haulm bark is $+32.70 \%$, and areca seed is $+7.59 \%$.

Keywords: Cork tree root, fig-tree haulm, areca seed, Ferric Thiocyanate, oleic acid, antioxidant activity

Title: Determination of antioxidation activity of vitamin C and some vegetable crude ethanolic extracts by Ferric Thiocyanate method (FTC)

TÓM TẮT

Dịch chiết ethanol thô từ vỏ rễ bần, vỏ thân sung, và hạt cau được dùng để xác định khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp Ferric Thiocyanate (FTC) với acid ascorbic được dùng làm chất chuẩn. Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic là $(88,09 \pm 0,27) \%$, cao ethanol vỏ rễ cây bần là $(41,99 \pm 0,07) \%$, vỏ thân sung là $(36,65 \pm 0,07) \%$, và hạt cau là $(79,16 \pm 0,13) \%$. So sánh kết quả đạt được với kết quả chống oxy hóa của vitamin C với acid ascorbic chuẩn cho thấy độ lệch là $8,37 \%$. Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) cho thấy phần trăm hoạt tính chống oxy hóa của acid ascorbic, cao ethanol vỏ rễ bần, vỏ thân sung, hạt cau trên hệ DPPH ở các giá trị SC50 ($\mu\text{g/mL}$) khác nhau lần lượt là $(91,0 \pm 0,3) \%$ ở $9,37 (\mu\text{g/mL})$, $(77,9 \pm 0,3) \%$ ở $32,28 (\mu\text{g/mL})$, $(82,9 \pm 0,3) \%$ ở $27,3 (\mu\text{g/mL})$, và $(89,9 \pm 0,2) \%$ ở $25,83 (\mu\text{g/mL})$. Đối chiếu kết quả chống oxy hóa của phương pháp FTC với phương pháp DHHP cho thấy độ sai lệch của acid ascorbic là $2,06 \%$, vỏ rễ cây bần là $25,09 \%$, vỏ thân cây sung là $32,7 \%$, và hạt quả cau là $7,59 \%$.

Từ khóa: rễ bần, thân sung, hạt cau, Ferric Thiocyanate, acid oleic, hoạt tính chống oxy hóa

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây bần-*Sonneratiaceae caseolaris* (L.), họ bần (*Sonneratiaceae*) nay là họ trăn châu (*Lythraceae*), cây sung-*Ficus racemosa*, họ dâu tằm (*Moraceae*), cây cau-*Areca catechu* L., họ Cau (*Areceaceae*) (Penpun *et al.*, 2006), là 3 loài thực vật khá phổ biến ở miền Nam, Việt Nam, đặc biệt là ở đồng bằng sông Cửu Long. Tuy ba loài cây này được dùng làm thuốc chữa bệnh theo phương pháp dân gian khá phổ biến nhưng hiệu quả chống oxy hóa chưa được quan tâm nhiều. Chính vì vậy, việc xác định hoạt tính chống oxy hóa tự nhiên của 3 loại cây này là rất cần thiết và quan trọng cho sự thay thế chất chống oxy hóa tổng hợp, giúp cân bằng hệ thống chống oxy hóa bên trong và ngoài cơ thể.

Có nhiều phương pháp khác nhau để xác định hoạt tính chống oxy hóa. Trong bài nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp Ferric Thiocyanate (FTC) với acid oleic thay acid linoleic cho sự hình thành hydroperoxide (Hoàng Kim Anh, 2005 và Olga and Eiji, 2003).

2 NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

Nguyên liệu là vỏ rễ bần, vỏ thân sung, hạt cau được thu hái, sau đó rửa sạch, loại bỏ tạp, cắt nhỏ và phơi khô trong bóng râm. Nguyên liệu sau khi phơi khô được xay nhỏ và ngâm trong cồn tuyệt đối. Sau đó chiết lấy cao và đem cô quay chân không. Nguyên liệu sau khi cô quay chân không đem trữ vào tủ lạnh cho đến khi sử dụng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007)

2.2 Điều chế cao ethanol thô

Các bước điều chế ethanol thô từ vỏ rễ bần, vỏ thân sung và hạt trái cau như sau:

- Vỏ rễ bần (2700 g) → chiết kiệt với 3 lít cồn 95° → cô quay → 72 g cao → ký hiệu cao EtOH (I).
- Vỏ thân sung (3800 g) → chiết kiệt với 3 lít cồn 95° → cô quay → 76 g cao → ký hiệu cao EtOH (II).
- Hạt trái cau (2650 g) → chiết kiệt với 3 lít cồn 95° cô quay → 86 g cao → ký hiệu cao EtOH (III).

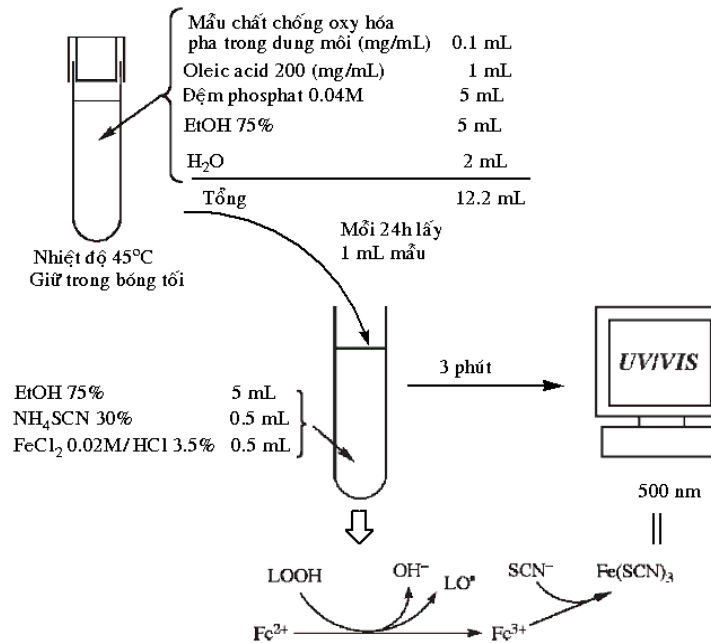
2.3 Phương pháp nghiên cứu

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp Ferric Thiocyanate (FTC) và α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH). Thực nghiệm bằng phương pháp Ferric Thiocyanate FTC. Các số liệu được xử lý và trình bày dưới dạng bảng biểu và biểu đồ trên phần mềm Microsoft Excel.

Trong khảo nghiệm này, hydroperoxide sinh ra bởi acid oleic thêm vào hỗn hợp phản ứng bị oxy hóa bởi không khí và nhiệt độ kèm trong thời gian thử nghiệm được đo gián tiếp. Sắt (II) clorua và ammonium thiocyanate phản ứng với nhau để tạo ra ferric thiocyanate (màu đỏ) nhờ hydroperoxide. Hỗn hợp thí nghiệm gồm có: 0,1 mL mẫu chất chống oxy hóa, 1 mL acid oleic 200 mg/mL, 5 mL đệm phosphat 0,04 M; 5 mL EtOH 75%, 2 mL nước cất và giữ ở 45°C, trong bóng tối. Hỗn hợp này cũng được chuẩn bị thêm phản ứng không có acid oleic để làm đối chứng. Sau

mỗi 24h lấy ra 1 mL mẫu, thêm 5 mL EtOH 75%, 0,5 mL NH₄SCN 30%, 0,5 mL FeCl₂ 0,02M trong HCl 3,5% tương ứng. Sau khi mẫu có màu đỏ, độ hấp thụ được đo ngay lập tức ở bước sóng 500 nm (Trần Thị Việt Hoa *et al.*, 2007). Sử dụng ethanol để hiệu chỉnh máy quang phổ về vạch 0.

Quá trình được thực hiện theo sơ đồ ở hình 1 (Akito Nagatsu, 2004).



Hình 1: Sơ đồ phương pháp FTC

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định tính chống oxy hóa bằng phương pháp FTC

Acid oleic và acid linoleic là 2 acid béo không no dễ bị oxy hóa sinh ra các hydroperoxide. Vì vậy, qui trình tiến hành được thay đổi bằng cách sử dụng acid oleic thay cho acid linoleic của phương pháp FTC (Kikuzaki và Nakatani, 1993 và Kikuzaki *et al.*, 2002) nhằm giảm kinh phí thực hiện và phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm. Thực hiện theo qui trình chỉnh sửa vẫn thu được kết quả độ hấp thụ của mẫu có vitamin C, cao ethanol vỏ rễ bần, cao ethanol vỏ thân sung, và cao ethanol hạt cau lần lượt được thể hiện trong các bảng 1, 2, 3 và 4. Độ hấp thụ tổng hợp của 5 mẫu theo ngày ở bước sóng 500 nm được thể hiện trong bảng 5 và hình 2. Độ hấp thụ tổng hợp của 4 mẫu theo nồng độ ở bước sóng 500 nm được thể hiện trong bảng 6 và hình 3. Phần trăm chống oxy hóa của 4 mẫu theo nồng độ được thể hiện trong bảng 7 và hình 4.

Bảng 1: Độ hấp thu của mẫu có vitamin C

Ngày/Nồng độ (mg/mL)	0	10	20	40	60
2	0,348	0,174	0,342	0,424	0,327
4	0,517	0,247	0,418	0,441	0,357
6	0,974	0,751	0,526	0,318	0,116
8	0,462	0,595	0,794	0,73	0,713

Bảng 2: Độ hấp thu của mẫu có cao ethanol vỏ rễ bần

Ngày/Nồng độ (mg/mL)	0	10	20	40	60
2	0,348	0,278	0,267	0,250	0,255
4	0,517	0,282	0,277	0,266	0,261
6	0,974	0,734	0,669	0,603	0,565
8	0,462	0,848	0,732	0,726	0,643

Bảng 3: Độ hấp thu của mẫu có cao ethanol vỏ thân sung

Ngày/Nồng độ (mg/mL)	0	10	20	40	60
2	0,348	0,255	0,253	0,295	0,220
4	0,517	0,376	0,213	0,293	1,035
6	0,974	0,765	0,725	0,662	0,617
8	0,462	0,802	0,812	0,801	0,738

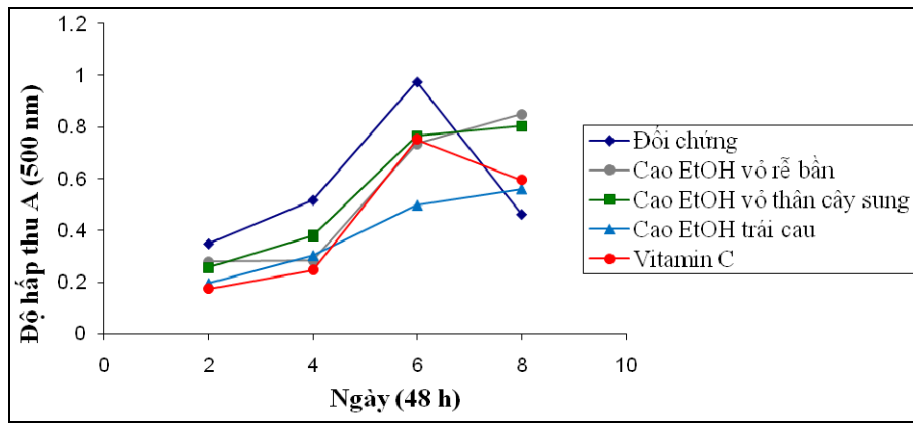
Bảng 4: Độ hấp thu của mẫu có cao ethanol hạt cau

Ngày/Nồng độ (mg/mL)	0	10	20	40	60
2	0,348	0,194	0,257	0,247	0,230
4	0,517	0,302	0,255	0,244	0,238
6	0,974	0,497	0,325	0,224	0,203
8	0,462	0,560	0,468	0,450	0,442

Bảng 5: Độ hấp thu tổng hợp của 5 mẫu theo ngày ở bước sóng 500 nm

Chất chống oxy hóa	Đối chứng	Vitamin C	EtOH (I)	EtOH (II)	EtOH (III)
Ngày	A	A	A	A	A
2	0,348	0,174	0,278	0,255	0,194
4	0,517	0,247	0,282	0,376	0,302
6	0,974	0,751	0,634	0,765	0,497
8	0,462	0,595	0,848	0,802	0,560

* Chú thích: EtOH (I): cao ethanol vỏ rễ bần, EtOH (II): cao ethanol vỏ thân sung, EtOH (III): cao ethanol hạt trái cau.



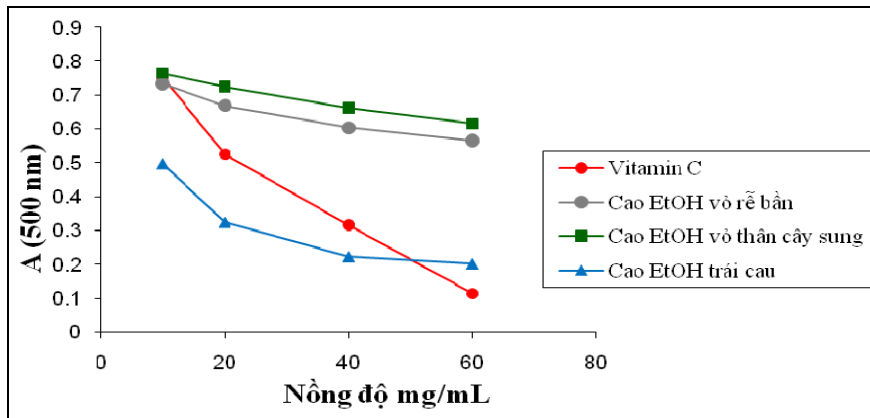
Hình 2: Độ hấp thu theo ngày

Như thể hiện trên hình 2, theo thời gian (ngày), mẫu đối chứng đạt hư hỏng nhanh hơn (độ hấp thu cực đại) vào ngày thứ 6.

Bảng 6: Độ hấp thu tổng hợp của 4 mẫu theo nồng độ ở bước sóng 500 nm

Chất chống oxy hóa C (mg/mL)	Vitamin C A	EtOH (I) A	EtOH (II) A	EtOH (III) A
10	0,751	0,734	0,765	0,497
20	0,526	0,669	0,725	0,325
40	0,318	0,603	0,662	0,224
60	0,116	0,565	0,617	0,203

* Chú thích: EtOH (I): cao ethanol vỏ rễ bần, EtOH (II): cao ethanol vỏ thân sung, EtOH (III): cao ethanol hạt trái cau.



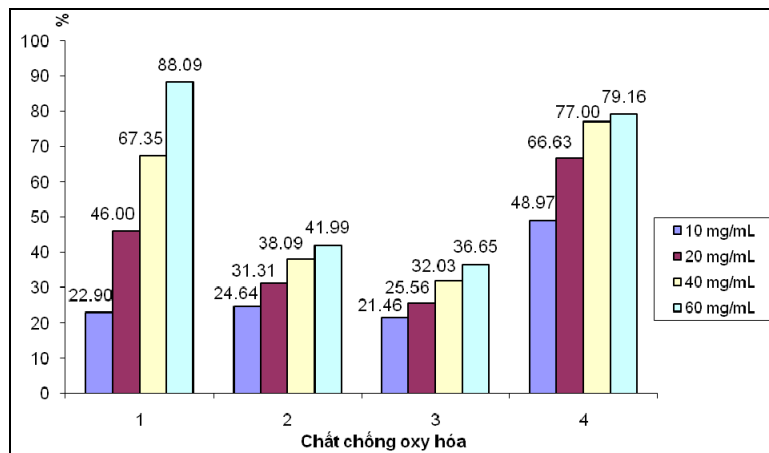
Hình 3: Độ hấp thu theo nồng độ

Như thể hiện trên hình 3, nồng độ chất chống oxy hóa càng cao thì khả năng chống oxy hóa càng mạnh trong hệ acid oleic.

Bảng 7: Phần trăm chống oxy hóa của 4 mẫu theo nồng độ

Chất chống oxy hóa C (mg/mL)	Vitamin C %	EtOH (I) %	EtOH (II) %	EtOH (III) %
10	22,90	24,64	21,46	48,97
20	46,00	31,31	25,56	66,63
40	67,35	38,09	32,03	77,00
60	88,09	41,99	36,65	79,16
SD (%)	0,27	0,07	0,07	0,13

* Chú thích: EtOH (I): cao ethanol vỏ rễ bần, EtOH (II): cao ethanol vỏ thân sung, EtOH (III): cao ethanol hạt trái cau.



*Chú thích: 1: Vitamin C, 2: EtOH (I), 3: EtOH (II), 4: EtOH (III).

Hình 4: Phần trăm chống oxy hóa theo nồng độ

Như thể hiện trên hình 4, phần trăm chống oxy hóa tăng theo nồng độ và tăng nhanh nhất là trường hợp 1 (Vitamin C).

3.2 Kết quả xác định tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Các mẫu có biểu hiện khả năng bắt gốc tự do $SC\% \geq 50\%$ (dương tính) sẽ được thử nghiệm tiếp để tìm giá trị SC_{50} (SC_{50} là % hoạt động của chất chống oxy hóa theo nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) trung hòa 50% gốc tự do DPPH) (Philip Molyneux, 2004).

Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết được thể hiện trong bảng 8. Theo bảng 8, khả năng bắt gốc tự do của mẫu cao tinh chế (vitamin C) cao nhất ở nồng độ 50 ($\mu\text{g/mL}$) và 3 mẫu cao chiết có khả năng bắt gốc tự do ở nồng độ 200 ($\mu\text{g/mL}$). Vì vậy, nồng độ để trung hòa 50% gốc tự do DPPH của vitamin C thấp hơn chục lần so với các mẫu cao chiết.

Bảng 8: Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết

STT	Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu (µg/mL)	SC%	SC ₅₀ (µg/mL)	Kết quả
1	Chứng (+)	50	86,09 ± 0,4	13,85	Dương tính
2	Chứng (-)	-	0,00 ± 0,0	-	Âm tính
3	Cao tinh chế	50	91,00 ± 0,3	9,37	Dương tính
4	Phước-Lan-Rắn (I)	200	77,90 ± 0,3	32,28	Dương tính
5	Phước-Lan-Rắn (II)	200	82,90 ± 0,3	27,30	Dương tính
6	Phước-Lan-Rắn (III)	200	89,90 ± 0,2	25,83	Dương tính

* Chú thích: Cao tinh chế là Vitamin C, chứng (+) cũng là Vitamin C. Phước-Lan-Rắn (I): cao ethanol vỏ rễ bần, Phước-Lan-Rắn (II): cao ethanol vỏ thân sùng, Phước-Lan-Rắn (III): cao ethanol hạt cau.

Kết quả so sánh giá trị vitamin C chuẩn giữa 2 phương pháp được thể hiện trong bảng 9. Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của vitamin C đã được xác định bằng phương pháp DPPH với % chống oxy hóa rất cao (99,93 %) và kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Deore *et al.* (2009).

Kết quả so sánh giá trị % chống oxy hóa các cao chiết giữa 2 phương pháp được thể hiện trong bảng 10. Theo bảng 10, % chống oxy hóa của các mẫu theo phương pháp FTC thấp hơn so với phương pháp DPPH và vitamin C luôn cao hơn các mẫu cao chiết ở cả 2 phương pháp.

Bảng 9: So sánh giá trị vitamin C chuẩn giữa 2 phương pháp

	Phương pháp DPPH	Phương pháp FTC	SD (%)
Nồng độ (mg/mL)	60	60	
%Chống oxy hóa	99,93 %	88,09 %	8,37

Bảng 10: So sánh giá trị % chống oxy hóa các cao chiết giữa 2 phương pháp

	Phương pháp DPPH	Phương pháp FTC	SD (%)
Cao tinh chế	91,0 %	88,09 %	2,06
Phước-Lan-Rắn (I)	77,9 %	41,99 %	25,39
Phước-Lan-Rắn (II)	82,9 %	36,65 %	32,07
Phước-Lan-Rắn (III)	89,9 %	79,16 %	7,59

* Chú thích: Cao tinh chế là Vitamin C.

Từ các kết quả và thảo luận ở trên cho thấy bước đầu thực hiện nên phương pháp có sự sai lệch rất lớn so với phương pháp DPPH. Vì vậy, nếu muốn khẳng định chính xác độ lệch và khả năng ứng dụng của phương pháp thực hiện thì cần phải có những nghiên cứu sâu hơn ở những điều kiện nhiệt độ, nồng độ mẫu khác nhau.

4 KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của bài nghiên cứu này, một số kết luận có thể rút ra như sau:

- Có thể dùng acid oleic thay cho acid linoleic trong phương pháp ferric thiocyanate (FTC).

- Cao ethanol thô chứa nhiều nhóm hợp chất có tác dụng chống oxy hóa tốt.
- Theo phương pháp FTC (đối với hệ oleic acid) thì nồng độ chất chống oxy hóa sử dụng gấp từ 100 đến 1000 lần so với phương pháp DPPH.
- Kết quả so sánh cho các giá trị độ lệch lớn có nghĩa là phương pháp thực hiện chưa đạt yêu cầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akito Nagatsu (2004), Investigation of antioxidative compounds from oil plant seed, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 29: 203-210.
- Deore S. L., Khadabadi, S.S., Baviskar, B.A., Khangenbam, R.A., Koli, U.S., Daga, N.P., Gadbaile, P.A., and Jain, P.A., (2009), In vitro antioxidant activity and phenolic content of croton caudatum, *International Journal of Chem. Tech. Research*, 1(2): 174-176.
- Hoàng Kim Anh (2005), *Hóa học thực phẩm*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà nội, (I), tr. 250-262.
- Kikuzaki H. and Nakatani N., (1993), Antioxidant effects of some ginger constituents, *Journal of Food Science*, 58(6): 407-410.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H., (2002), Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 2161-2168.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, tr.12-16.
- Olga, B. and Eija, V., (2003), Antioxidants, oxydative damage and oxygen deprivation stress, *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Penpun, W., Thawatchai, P., Chutima, L., and Sindhchai, K., (2006), The study of antioxidant capacity in various parts of areca catechu L., *Naresuan University Journal*, 14(1): 1-14.
- Philip Molyneux (2004), The use of the stable free radical diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- Trần Thị Việt Hoa, Trần Thị Phương Thảo và Vũ Thị Thanh Tâm (2007), Thành phần hóa học và tính chống oxy hóa của nghệ đen *Curcuma zedoaria* Berg. trồng ở Việt Nam, *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*, tập 10, tr. 37-48.