

Hoạt tính chống oxy hóa, đối kháng của cao chiết từ lá và thành phần tinh dầu loài Bưởi bung (*Acronychia pedunculata* (L.) Miq.)

Phùng Thị Tuyên^{1*}, Ma Minh Nguyệt¹, Phạm Thanh Hà¹, Nguyễn Như Ngọc²

¹Khoa Quản lý tài nguyên rừng và môi trường, Trường Đại học Lâm nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài 22/9/2020; ngày chuyển phản biện 2/10/2020; ngày nhận phản biện 23/11/2020; ngày chấp nhận đăng 16/12/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số, hoạt tính chống oxy hóa và đối kháng của cao chiết từ lá và thành phần các chất có trong tinh dầu từ lá Bưởi bung (*Acronychia pedunculata* (L.) Miq.). Kết quả cho thấy, dịch chiết lá Bưởi bung khi sử dụng dung môi ethanol 100% (E100) có hàm lượng polyphenol và flavonoid thấp hơn dịch chiết khi sử dụng ethanol 70% (E70). Tuy vậy, hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ dung môi E100 ($IC_{50}=612,9\pm 12,9$ $\mu\text{g/ml}$) lại mạnh hơn dịch chiết từ dung môi E70 ($IC_{50}=1225,5\pm 6,9$ $\mu\text{g/ml}$). Về hoạt tính đối kháng, dịch chiết lá Bưởi bung từ E100 và E70 ức chế sinh trưởng chiều dài rễ của Cải củ nhưng lại kích thích tăng trưởng chiều dài rễ của Xà lách. Đặc biệt, ở nồng độ 3 mg/ml dịch chiết từ E100 đã ức chế sinh trưởng rễ của Cải củ tới 48,1%. Khi sử dụng dung môi là nước, dịch chiết thu được đều làm giảm khả năng sinh trưởng rễ của cả hai loài Cải củ và Xà lách. Hỗn hợp tinh dầu lá Bưởi bung và nước thu được khi sử dụng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước được phân tích bằng máy sắc ký khí khối phổ (GC-MS). Kết quả đã xác định được 33 hợp chất, trong đó các hợp chất chính bao gồm caryophyllene (47,09%), humulene (17,28%), α -copaene (4,98%), isodene (3,59%) và (-)- α -panasinsen (3,51%), các chất còn lại chiếm tỷ lệ nhỏ hơn 3%.

Từ khóa: bưởi bung, caryophyllene, hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính đối kháng, tinh dầu.

Chỉ số phân loại: 1.4

Đặt vấn đề

Thực vật nói chung và thực vật có chứa các hoạt chất sinh học nói riêng có ý nghĩa quan trọng đối với con người. Các loài thực vật này đã được sử dụng để cung cấp thực phẩm, thuốc chữa bệnh, mỹ phẩm, nguyên vật liệu phục vụ cuộc sống của con người [1].

Chi *Acronychia* thuộc họ Cam (Rutaceae) gồm 50 loài, chủ yếu là cây bụi, cây gỗ nhỏ, phân bố tự nhiên ở các vùng nhiệt đới như Ấn Độ, Sri Lanka, Malaysia, phía nam Trung Quốc, New Caledonia và phía tây châu Úc [2, 3]. Tuy nhiên, vùng lớn nhất có các loài trong chi này đa dạng nhất là New Guinea và Tây Úc [2]. Trong số các loài thuộc chi *Acronychia*, Bưởi bung là cây gỗ nhỏ thường xanh, cành, lá và quả có tinh dầu thơm. Rễ, thân, lá và quả Bưởi bung được sử dụng như một loại dược liệu để chữa các bệnh như tiêu chảy, ho, hen suyễn, mụn nhọt, viêm da, mẩn ngứa, da bong vảy, đau nhức, thấp khớp [3, 4]. Ngoài ra, Bưởi bung được dùng như một loại thuốc chữa hạ sốt và cầm máu [3].

*Tác giả liên hệ: Email: phungtuyen@gmail.com

Mặc dù Bưởi bung là một loài cây có nhiều giá trị được liệt kê, nhưng những nghiên cứu về hoạt tính sinh học và các hợp chất thiên nhiên của loài cây này còn hạn chế. Vì vậy, việc làm rõ một số hoạt tính sinh học của Bưởi bung, bao gồm hoạt tính đối kháng, hoạt tính chống oxy hóa, hàm lượng tinh dầu và thành phần các chất có trong tinh dầu Bưởi bung sẽ góp phần là cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo để làm rõ giá trị dược lý của loài, từ đó có biện pháp khai thác và sử dụng bền vững trong tương lai.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng: nghiên cứu thực hiện với loài Bưởi bung (*Acronychia pedunculata* (L.) Miq.) thuộc họ Cam (Rutaceae). Cành mang lá, hoa và cành mang lá, quả của loài Bưởi bung thu tại khu danh thắng Tây Thiên thuộc tỉnh Vĩnh Phúc (hình 1). Mẫu tiêu bản đang được lưu trữ tại Bộ môn Thực vật rừng, Khoa Quản lý tài nguyên rừng và môi trường, Trường Đại học Lâm nghiệp.

Antioxidant, allelopathic activities of leaf extracts and essential oil compositions of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq.

Thi Tuyen Phung^{1*}, Minh Nguyet Ma¹, Thanh Ha Pham¹, Nhu Ngoc Nguyen²

¹Faculty of Forest Resources and Environmental Management, Vietnam National University of Forestry

²College of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry

Received 22 September 2020; accepted 16 December 2020

Abstract:

This research aims to exploit total polyphenol, flavonoid contents, antioxidant and allelopathic activities of leaf extracts, and essential oil compositions from leaves of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. The results indicated that the leaf extract from ethanol 100% (E100) possessed a lower total polyphenol and flavonoid content than the extract from ethanol 70% (E70). In contrast, the antioxidant activity from E100 extract with $IC_{50}=612.9\pm 12.9$ $\mu\text{g/ml}$ was stronger than that of E70 extract with $IC_{50}=1225.5\pm 6.9$ $\mu\text{g/ml}$. Regarding allelopathic activity, while the extracts from E100 and E70 inhibited root growth of radish, both extracts promoted root growth of lettuce. Especially, E100 extract with 3 mg/ml inhibited root growth of radish up to 48.1%. Moreover, using water solvents, the extracts reduced root growth of both the radish and lettuce. By GC-MS analyses, 33 compounds were identified from *A. pedunculata* essential oil. The major constituents were caryophyllene (47.09%), humulene (17.28%), α -copaene (4.98%), isodene (3.59%), and (-)- α -panasinsen (3.51%), other compounds were accounted for lower 3%.

Keywords: *Acronychia pedunculata* (L.) Miq., allelopathic activity, antioxidant activity, caryophyllene, essential oil.

Classification number: 1.4



(A)

(B)

(C)

(D)

Hình 1. Bưởi bung *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. (A) Cảnh mang lá và nụ hoa; (B) Hoa; (C) Quả; (D) Lá và hoa.

Một lượng mẫu lá (2 kg) được rửa sạch bằng nước và sấy khô ở nhiệt độ 50°C, sau đó nghiền thành bột. Mẫu được sử dụng để xác định hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính đối kháng, xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số. Mẫu lá tươi Bưởi bung được sử dụng để chưng cất tinh dầu và xác định thành phần các hợp chất có trong tinh dầu.

Hạt giống Cải củ (*Raphanus sativus* L.) và Xà lách (*Lactuca sativa* L.) là sản phẩm của Công ty Giống cây trồng Hoàng Nông. Tỷ lệ nảy mầm của hai loại hạt giống này là >80%. Cải củ và Xà lách được lựa chọn trong nghiên

cứ này vì đây là loài cây hai lá mầm, rất nhạy cảm và được sử dụng phổ biến trong việc nghiên cứu hoạt tính đối kháng của các loài thực vật [5].

Hóa chất: gồm các dung môi ethanol và methanol độ tinh khiết >98% được cung cấp bởi Công ty Hóa chất Biển xanh (Hà Nội). Các hóa chất 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu's reagent, Na_2CO_3 , NaOH, AlCl_3 được mua từ Sigma-Aldrich.

Chuẩn bị dịch chiết từ Bưởi bung: 10 g mẫu bột khô

lá Bưởi bung được ngâm trong dung môi ethanol 100% (E100) và dung môi ethanol 70% (E70) trong vòng 24h ở nhiệt độ phòng, sau đó dịch chiết được lọc bằng giấy lọc (GB/T1914-2007 xuất xứ Trung Quốc). Quy trình ngâm mẫu được lặp lại 3 lần. Dịch chiết được gom lại và tách dung môi bằng máy cô quay (EYELA Rotary evaporator N1000, EYELA OIL BATH OSB-2000, Tokyo Rikakikai Co., LTD) ở nhiệt độ 50°C. Cao chiết thu được hòa tan bằng dung môi methanol 100% để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo gọi là dịch chiết.

Mẫu bột khô (5 g) được ngâm trong 100 ml nước cất trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng, sau đó dịch chiết được lọc bằng giấy lọc (GB/T1914-2007 xuất xứ Trung Quốc). Dịch chiết thu được từ 5 g bột khô/100 ml nước cất được coi là nồng độ 5%. Sau đó dung dịch mẫu 5% được pha loãng bằng nước cất tới nồng độ 2,5 và 1%.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số: hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton và cs (1999) [6]. Một lượng dung dịch mẫu là 500 µl (nồng độ 100 µg/ml) được trộn với 250 µl Folin-Ciocalteu (20%), hỗn hợp được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Một lượng 250 µl dung dịch Na₂CO₃ 10% được cho thêm vào, hỗn hợp được ủ tiếp ở nhiệt độ 37°C trong vòng 30 phút trong tối. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 765 nm bằng máy Multiskan™ Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Osaka, Japan). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hàm lượng phenol tổng số được xác định bằng cách sử dụng đường chuẩn từ gallic acid (nồng độ 2-10 µg/ml). Hàm lượng phenol tổng số được quy đổi thông qua hàm lượng tương đương của gallic acid (µg gallic acid/g chất khô) theo công thức $y = 0,073x + 0,071$ ($R^2=0,999$).

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Bag và cs (2015) [7]. Dung dịch mẫu là 400 µl (100 µg/ml) được hòa tan trong methanol cho phản ứng với 40 µl dung dịch NaNO₂ 5%. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Một lượng 40 µl dung dịch AlCl₃ 10% được cho thêm vào hỗn hợp và lắc đều. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 6 phút. Dung dịch NaOH 1 M (400 µl) và 120 µl H₂O được cho thêm vào hỗn hợp và trộn đều. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 510 nm sử dụng máy Multiskan™ Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Osaka, Japan). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hàm lượng flavonoid tổng số được tính toán thông qua việc sử dụng quercetin làm chất chuẩn nồng độ (20-100 µg/ml) và quy đổi tương đương µg quercetin/g chất khô) theo công thức $y = 0,005x + 0,076$.

Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá Bưởi bung: khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ lá cây Bưởi bung được thực hiện theo phương pháp DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) [8]. Phản ứng bao gồm 500 µl dịch chiết (nồng độ 100-1500 mg/ml), 500 µl DPPH (6×10^{-4} M) và 250 µl acetact buffer (pH=5), thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối 15 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. IC₅₀ (Inhibition concentration) là nồng độ mà dịch chiết ức chế được 50% gốc tự do của DPPH được xác định. Gallic acid được sử dụng làm chất đối chứng dương.

% ức chế gốc tự do DPPH = (Abs đối chứng - Abs mẫu) / Abs đối chứng × 100. Trong đó: Abs đối chứng là độ hấp thụ của mẫu đối chứng; Abs mẫu là độ hấp thụ của hỗn hợp dung dịch có mặt của dịch chiết Bưởi bung.

Nghiên cứu hoạt tính đối kháng của dịch chiết Bưởi bung đối với Cải củ và Xà lách: dịch chiết lá Bưởi bung 4 ml nồng độ 1, 2, 3 mg/ml được bơm lần lượt vào đĩa petri (đường kính 9 cm) có lót 2 lớp giấy mềm. Sau 6h, dung môi methanol đã bay hơi hết, 4 ml nước cất được bơm vào từng đĩa petri. Hạt giống của 2 loài Cải củ và Xà lách (20 hạt) được gieo vào đĩa Petri. Công thức đối chứng sử dụng nước cất thay cho dịch chiết. Tất cả các công thức thí nghiệm trên được bố trí ở nhiệt độ 25-27°C, sử dụng đèn LED chiếu sáng (Led grow light - Model: A600 W-S, LED power 600W - China) với thời gian chiếu sáng là 10h/ngày. Lượng nước cất 2 ml được thêm vào mỗi đĩa petri 2 ngày/lần. Số lượng hạt nảy mầm, chiều dài của thân (chồi) và rễ được đo đếm sau 7 ngày. Các công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần [9].

Dịch chiết lá Bưởi bung bằng nước cất (4 ml) với các nồng độ khác nhau 5, 2,5, 1% được bơm lần lượt vào đĩa petri (đường kính 9 cm) có lót 2 lớp giấy mềm. Hạt giống (20 hạt) của hai loài thực vật bao gồm Cải củ và Xà lách được gieo vào đĩa petri. Công thức đối chứng được thực hiện với nước cất. Tất cả các công thức thí nghiệm được đặt ở nhiệt độ phòng 25-27°C với thời gian chiếu sáng sử dụng đèn LED (Led grow light - Model: A600 W-S, LED power 600W - China) là 10h/ngày. Lượng nước cất 2 ml được thêm vào mỗi đĩa petri 2 ngày/lần. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số lượng hạt nảy mầm, chiều dài của thân (chồi) và rễ được đo đếm sau 7 ngày [8].

Xác định hàm lượng tinh dầu của Bưởi bung: hàm lượng tinh dầu thu được được xác định theo công thức của Dược điển Việt Nam (1971).

$$X = \frac{a \cdot 100}{b}$$

Trong đó: X là hàm lượng tinh dầu (ml/g); a là thể tích của tinh dầu chung cất được; b là khối lượng của mẫu khô.

Xác định thành phần hợp chất có trong tinh dầu của Bưởi bung: thành phần của tinh dầu được phân tích bằng máy sắc ký khí khối phổ GC-MS (GC7890B-MS 5977A-Agilent) với cột DB-5MS (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 μm Agilent Technologies, J & W Scientific Products, Folsom, CA, USA). Chương trình nhiệt độ: 50°C giữ một phút, sau đó tăng đến 280°C với tốc độ gia nhiệt 5°C/phút và giữ một phút. Nhiệt độ injector là 200°C, tốc độ khí mang là 1 ml/phút. Nhiệt độ nguồn ion là 230°C, nhiệt độ tứ cực là 150°C và khoảng quét là 45-500 amu. Các chất được xác định bằng cách so sánh với các chất có trong thư viện NiSt.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 16.0 (Minitab Inc., State College, PA, USA) thông qua phân tích phương sai ANOVA một nhân tố. Sự khác biệt có ý nghĩa được kiểm tra bằng cách sử dụng Tukey's test (p=0,05) và được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (standard deviation). Tỷ lệ nảy mầm được tính toán bằng công thức số lượng hạt nảy mầm của từng công thức thí nghiệm/số hạt giống được gieo trên đĩa × 100.

Tỷ lệ % ức chế sinh trưởng = 100% - [(chiều dài thân hoặc rễ của công thức thí nghiệm/chiều dài thân hoặc rễ của công thức đối chứng) × 100].

Kết quả và thảo luận

Hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số và hoạt tính chống oxy hóa

Hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của Bưởi bung được chiết xuất bằng dung môi ethanol E100 và E70 được thể hiện trong bảng 1. Kết quả cho thấy, dịch chiết E70 có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số cao hơn dịch chiết E100 tương ứng với 2,7 và 3,1 lần.

Bảng 1. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số của dịch chiết Bưởi bung.

Dung môi	Polyphenol (μg/g bột khô)	Flavonoid (μg/g bột khô)	DPPH IC ₅₀ (μg/ml)
E100	0,62±0,03 ^b	32,03±8,12 ^b	612,9±12,9 ^b
E70	1,68±0,20 ^a	97,72±9,81 ^a	1225,5±6,9 ^c
Gallic acid			66,8±1,9 ^a

Số liệu trong bảng được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05). Giá trị IC₅₀ càng nhỏ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh.

Khả năng chống oxy hóa của dịch chiết E100 và E70 của Bưởi bung được xác định thông qua khả năng khử gốc tự do DPPH (bảng 1). Hiệu quả loại bỏ gốc tự do của dịch chiết được xác định thông qua giá trị IC₅₀ (là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do của DPPH). Giá trị IC₅₀ càng nhỏ thì hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh. Căn cứ vào giá trị IC₅₀ cho thấy, dịch chiết từ E100 có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn so với dịch chiết từ E70. Điều này có nghĩa là hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số tỷ lệ nghịch với hoạt tính chống oxy hóa.

Hoạt tính đối kháng của dịch chiết từ lá Bưởi bung bằng dung môi ethanol đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ

Dịch chiết Bưởi bung E100 và E70 với các nồng độ khác nhau đều ảnh hưởng đến quá trình nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ (bảng 2). Dịch chiết E100 (3 mg/ml) ức chế khả năng nảy mầm của Cải củ (tỷ lệ nảy mầm đạt 83,3%) mạnh hơn so với các nồng độ dịch chiết khác và đối chứng. Tuy nhiên, kết quả thống kê không có sự khác biệt về tỷ lệ nảy mầm giữa các công thức thí nghiệm. Bên cạnh đó, dịch chiết E100 tại nồng độ 2 và 3 mg/ml ức chế sinh trưởng chiều dài thân và rễ của Cải củ mạnh hơn so với các công thức thí nghiệm khác và đối chứng (p<0,05).

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết Bưởi bung bằng dung môi ethanol đến tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ.

Dung môi	Nồng độ (mg/ml)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài thân (mm)	Chiều dài rễ (mm)
E100	1	96,7±5,8 ^a	7,6±2,8 ^{ab} (0,9)	59,3±23,5 ^a (13,5)
	2	90,00±5,0 ^a	6,0±2,9 ^b (21,3)	36,4±20,9 ^b (46,9)
	3	83,3±10,4 ^a	6,1±3,2 ^b (19,5)	35,6±22,9 ^b (48,1)
E70	1	95,0±6,0 ^a	6,1±2,6 ^b (20,6)	62,4±33,1 ^a (9,0)
	2	85,0±5,0 ^a	9,3±5,7 ^a (-22,5)	55,4±32,9 ^a (19,3)
	3	86,7±7,6 ^a	8,6±4,4 ^a (-12,6)	56,8±29,0 ^a (17,2)
Đối chứng		100±0,0 ^a	7,6±2,9 ^{ab} (0,0)	68,6±23,7 ^a (0,0)

Số liệu trong bảng được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05). Số liệu trong dấu ngoặc đơn là tỷ lệ % ức chế của cao chiết so với đối chứng. Giá trị trong ngoặc đơn với dấu (-) nghĩa là tỷ lệ % kích thích so với đối chứng. Công thức đối chứng sử dụng nước cất thay cho dịch chiết.

Đối với dịch chiết E70, nồng độ 1 mg/ml có khả năng ức chế chiều dài thân của Cải củ mạnh hơn so với 2 nồng độ còn lại và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với kết quả của công thức đối chứng (p<0,05).

Khi so sánh hoạt tính đối kháng của dịch chiết từ hai loại dung môi E100 và E70, cho thấy dịch chiết lá Bưởi bung từ E100 có hoạt tính mạnh hơn E70.

Hoạt tính đối kháng của dịch chiết lá Bưởi bung bằng dung môi ethanol đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của Xà lách

Dịch chiết Bưởi bung từ E100 và E70 đều có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ nảy mầm của Xà lách (bảng 3). Trong đó, dịch chiết E70 thể hiện khả năng ức chế nảy mầm Xà lách cao hơn so với dịch chiết E100. Nồng độ của dịch chiết không ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm của Xà lách, bởi khi nồng độ tăng lên thì tỷ lệ nảy mầm của Xà lách không giảm. Dịch chiết E70, nồng độ 1 mg/ml có khả năng ức chế mạnh hơn tới khả năng nảy mầm của Xà lách với tỷ lệ nảy mầm là 75% so với các công thức thí nghiệm khác.

Dịch chiết Bưởi bung E100 và E70 kích thích tăng trưởng mạnh chiều dài rễ của Xà lách (bảng 3). Dịch chiết E100 nồng độ 2 mg/ml có khả năng kích thích mạnh nhất chiều dài rễ của Xà lách (41,9 mm), tương đương với tăng 66,6% chiều dài rễ khi so sánh với kết quả đối chứng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch chiết Bưởi bung từ dung môi ethanol đến tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của Xà lách.

Dung môi	Nồng độ (mg/ml)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài thân (mm)	Chiều dài rễ (mm)
E100	1	88,3±5,8 ^{ab}	3,2±1,7 ^a (-2,7)	38,6±21,5 ^{ab} (-53,2)
	2	95,0±0,0 ^a	3,0±1,3 ^a (3,2)	41,9±22,3 ^a (-66,6)
	3	86,7±5,8 ^{ab}	2,8±1,5 ^a (9,7)	32,1±19,7 ^{abc} (-27,5)
E70	1	75,0±10 ^b	2,9±2,0 ^a (7,0)	30,6±21,6 ^a (-21,6)
	2	80,0±5,0 ^{ab}	3,1±2,1 ^a (0,0)	30,7±22,9 ^{bc} (-21,9)
	3	83,3±5,8 ^{ab}	3,3±1,8 ^a (-6,5)	34,7±21,1 ^{abc} (-37,9)
Đối chứng		90,0±5,0 ^{ab}	3,1±1,8 ^a (0,0)	25,2±13,6 ^a (0,0)

Số liệu trong bảng được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05). Số liệu trong dấu ngoặc đơn là tỷ lệ % ức chế của cao chiết so với đối chứng. Giá trị trong ngoặc đơn với dấu (-) nghĩa là tỷ lệ % kích thích so với đối chứng. Công thức đối chứng sử dụng nước cất thay cho dịch chiết.

Hoạt tính đối kháng của dịch chiết từ lá Bưởi bung bằng nước đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ và Xà lách

Dịch chiết Bưởi bung từ nước ức chế mạnh tới quá trình nảy mầm của Cải củ khi so sánh với công thức đối chứng (bảng 4). Trong đó, nồng độ 5% có ảnh hưởng mạnh hơn đến khả năng nảy mầm của Cải củ so với nồng độ 1 và 2,5%. Tỷ lệ nảy mầm của Cải củ đạt 48,3% khi áp dụng dịch

chiết Bưởi bung 5% và giảm 41,7% so với công thức đối chứng (bảng 4). Dịch chiết bằng nước từ lá Bưởi bung cũng làm giảm quá trình nảy mầm của Xà lách. Tỷ lệ nảy mầm của Xà lách chỉ đạt 80% khi áp dụng dịch chiết Bưởi bung nồng độ 1% và giảm 18,3% so với công thức đối chứng.

Dịch chiết lá Bưởi bung ảnh hưởng rõ rệt tới sinh trưởng chiều dài rễ của Cải củ. Trong đó, nồng độ 5% đã làm giảm 46,7 mm chiều dài rễ của Cải củ, tương đương với khả năng ức chế mạnh tới 77,2% khi so sánh với đối chứng. Nồng độ 1 và 2,5% cũng làm giảm chiều dài rễ của Cải củ 44,9-49,0% so với đối chứng (bảng 4).

Đối với Xà lách, nồng độ 2,5 và 5% làm tăng chiều dài thân của Xà lách lần lượt 13,2 và 30,2%, nhưng lại làm giảm chiều dài rễ của Xà lách 14,5 và 38,8% (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết bằng nước từ lá Bưởi bung đến tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ và Xà lách.

Nồng độ (%)	Loại cây	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều dài thân (mm)	Chiều dài rễ (mm)
1	Cải củ	51,7±2,9 ^b	5,5±5,9 ^b (30,4)	33,4±36,7 ^b (44,9)
2,5		78,3±10,4 ^a	11,3±6,4 ^a (-43,5)	30,9±20,6 ^b (49,0)
5		48,3±16,1 ^b	7,9±8,5 ^b (0,0)	13,8±16,0 ^c (77,2)
Đối chứng		90,0±5,0 ^a	7,9±3,4 ^b (0,0)	60,5±29,4 ^a (0,0)
1	Xà lách	80,0±10,0 ^b	5,1±3,4 ^b (3,5)	26,9±18,3 ^{ab} (19,6)
2,5		86,7±5,8 ^{ab}	6,0±3,5 ^{ab} (-13,2)	28,7±17,4 ^a (14,5)
5		91,67±2,89 ^{ab}	6,9±4,5 ^a (-30,2)	20,5±10,6 ^b (38,8)
Đối chứng		98,3±2,9 ^a	5,3±2,0 ^b (0,0)	33,5±13,4 ^a (0,0)

Số liệu trong bảng được biểu diễn bằng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05). Số liệu trong dấu ngoặc đơn là tỷ lệ % ức chế của cao chiết so với đối chứng. Giá trị trong ngoặc đơn với dấu (-) nghĩa là tỷ lệ % kích thích so với đối chứng. Công thức đối chứng sử dụng nước cất thay cho dịch chiết.

Hàm lượng tinh dầu và các hợp chất có trong tinh dầu loài Bưởi bung

Kết quả xác định hàm lượng tinh dầu của Bưởi bung là 0,09% v/w trọng lượng khô.

Hỗn hợp tinh dầu lá Bưởi bung và nước sau khi phân tích bằng máy sắc ký khối phổ (GC-MS) đã xác định được 33 hợp chất (bảng 5). Trong đó, các hợp chất chính bao gồm caryophyllene (47,09%), humulene (17,28%), α-copaene (4,98%), isodene (3,59%) và (-)-α-panasinsen (3,51%), các hợp chất còn lại có hàm lượng chiếm tỷ lệ nhỏ hơn 3%.

Bảng 5. Các hợp chất trong tinh dầu của Bưởi bung xác định bằng máy sắc ký khí khối phổ (GC-MS).

TT	Tên hợp chất tinh dầu	Thời gian xuất hiện	Diện tích của peak sắc ký	% diện tích peak sắc ký (% Area)
1	α -pinene	6,66	91251	1,20
2	β -pinene	8,06	5301	0,07
3	2-carene	8,82	1215	0,02
4	D-limonene	9,18	13540	0,18
5	Eucalyptol	9,27	11352	0,15
6	3-carene	9,61	6504	0,09
7	γ -terpinene	9,98	4745	0,06
8	Nerolidyl acetate	11,17	2437	0,03
9	Camphor	12,56	4540	0,06
10	Carotol	16,49	70378	0,92
11	α -guaiene	18,38	8294	0,11
12	Isolodene	18,52	273462	3,59
13	γ -muurolene	18,69	139454	1,83
14	α -copaene	18,83	379622	4,98
15	β -panasinsene	19,28	43178	0,57
16	β -clovene	19,40	8151	0,11
17	Isocaryophyllene	19,57	21679	0,28
18	(-)-aristolene	19,64	90747	1,19
19	Guaia-3,9-diene	19,75	89078	1,17
20	Longifolene-(V4)	19,86	58730	0,77
21	Caryophyllene	19,98	3589978	47,09
22	(-)- α -panasinsen	20,34	267459	3,51
23	Isocaryophyllene	20,43	153855	2,02
24	β -neoclovene	20,63	215222	2,82
25	Longifolene	20,71	9943	0,13
26	Humulene	20,87	1317042	17,28
27	Alloaromadendrene	20,98	142596	1,87
28	Guaia-1(10),11-diene	21,30	81728	1,07
29	Neoisolongifolene	21,64	82083	1,08
30	Thujopsene-I3	21,74	99803	1,31
31	γ -muurolene	22,28	40583	0,53
32	Epizonarene	22,39	172754	2,27
33	γ -himachalene	23,46	5847	0,08

Thảo luận

Chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người. Các hợp chất này giúp bảo vệ cơ thể và loại bỏ các tác nhân gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe, hạn chế được các bệnh như cao huyết áp, thần kinh... [10]. Phương pháp DPPH đã được sử dụng rộng rãi để kiểm tra khả năng loại bỏ gốc tự do và nhóm hydro của các dịch chiết từ thực vật [11]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa thông qua phương pháp DPPH của lá Bưởi bung đã được xác định. Kết quả so sánh giá trị IC_{50} của Bưởi bung từ E100 (612,9 $\mu\text{g/ml}$) thấp hơn so với Cà gai

leo (*Solanum hainanense* Hance) (1734 $\mu\text{g/ml}$) và cây Nhàu (*Morinda citrifolia*) từ lá, trái xanh, rễ cây Nhàu với giá trị IC_{50} lần lượt là 917,16, 1025,2 và 1531,4 $\mu\text{g/ml}$ và Hà thủ ô (*Streptocaulon juvenas*) IC_{50} là 2586 $\mu\text{g/ml}$ [11]. Điều này có nghĩa là khả năng chống oxy hóa của Bưởi bung là cao hơn so với các loài được so sánh (giá trị IC_{50} càng nhỏ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh).

Các loài trong chi *Acronychia* đã được chứng minh là có hàm lượng tinh dầu từ 0,1 đến 0,5%, chỉ riêng loài *Acronychia oblongifolia* có hàm lượng 1,3-1,8% [2]. Bưởi bung trong nghiên cứu này được xác định là có hàm lượng 0,09% v/w. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Brophy và cs (2004) [2]. Với 33 hợp chất được xác định trong thành phần tinh dầu, Caryophyllene có hàm lượng lớn nhất (bảng 5). Có 4 hợp chất được tìm thấy trùng với nghiên cứu trước đó là α -pinene, β -pinene, alloaromadendrene và humulene [12]. Kết quả của nghiên cứu này khác so với kết quả đã công bố trước đó. Cụ thể là, nghiên cứu trước đã chỉ ra lá Bưởi bung có hàm lượng chất pinene là lớn nhất 57,4% [12]. Điều này có thể lý giải là do thời gian lấy mẫu khác nhau và cây phân bố ở các khu vực khác nhau nên hàm lượng các chất có trong tinh dầu sẽ thay đổi.

Nghiên cứu về chất đối kháng từ thực vật đã được chú ý trong những năm gần đây và được áp dụng nhiều trong nông nghiệp để phòng trừ cỏ dại thay cho việc dùng chất diệt cỏ [9]. Chất đối kháng có trong dịch chiết và bột nghiền từ nhiều loài thực vật đã khẳng định khả năng ức chế cảm nhiễm đối với nhiều loài thực vật khác và được sử dụng trong việc kiểm soát cỏ [5]. Mặc dù, hoạt tính của các chất đối kháng từ thực vật thực tế có thể yếu hơn so với các chất diệt cỏ tổng hợp, nhưng nó sẽ giúp tiến tới một nền nông nghiệp sạch và phát triển bền vững khi có sự kết hợp chỉ một lượng rất nhỏ chất diệt cỏ tổng hợp với chất đối kháng từ thực vật [13]. Kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra lá của Bưởi bung có hoạt tính đối kháng. Điều này được chứng minh bởi những ảnh hưởng khác nhau từ dịch chiết lá Bưởi bung tới tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của Cải củ và Xà lách (bảng 2-4). Nguyên nhân là do các chất đối kháng tồn tại trong dịch chiết từ lá của Bưởi bung. Chất đối kháng có khả năng làm cho các tế bào thân và rễ của các loài thực vật bị thay đổi vị trí sắp xếp, thay đổi cấu trúc tế bào và cuối cùng sẽ làm hư hại tới tế bào thân và rễ [8, 14]. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, rễ của Cải củ và Xà lách bị ảnh hưởng từ dịch chiết của Bưởi bung nhiều hơn thân, điều này đã được giải thích bởi Yoshimura và cs (2011) [15]. Nguyên nhân là do tế bào rễ trực tiếp tiếp xúc với dịch chiết của Bưởi bung trên đĩa petri, nên nồng độ của chất đối kháng thực vật ở phần rễ là cao hơn so với ở phần thân. Mặt khác, tế bào thân được bảo vệ tốt bởi tầng cu tin, còn tế bào rễ lại không được bảo vệ tốt như tế bào thân, điều này làm cho chất đối kháng ảnh hưởng tới tế bào rễ lớn hơn tế bào ở phần thân. Do vậy, quá trình sinh trưởng của rễ sẽ bị ảnh hưởng nhiều hơn so với tế bào thân.

Đã từ lâu, các hợp chất polyphenol như phenolic hay flavonoid được coi là chất đối kháng phổ biến có trong thực vật và đã được chứng minh bởi nhiều nhà khoa học trên thế giới [9, 16, 17]. Nhóm chất phenolic được sử dụng trong một số lĩnh vực sản xuất thuốc trừ sâu, chất gây nở, chất độc hay thuốc nhuộm. Bên cạnh đó, nhiều hợp chất phenolic có thể dùng để tẩy màu trong công nghiệp chế biến giấy, và đặc biệt một phần không thể thiếu đó là polyphenol đã đóng vai trò quan trọng trong nông lâm nghiệp như một loại chất diệt cỏ, trừ sâu và nấm [17].

Nghiên cứu tìm ra một nguồn chất đối kháng mới có hoạt tính cao là rất cần thiết để áp dụng cho các sản phẩm sinh học trong việc phòng trừ cỏ dại. Việc khẳng định được hoạt tính đối kháng của lá Bưởi bung trong nghiên cứu này là điểm mới chưa được thực hiện trong bất cứ nghiên cứu nào trước đó. Mặc dù chi tiết về các hợp chất có trong dịch chiết từ dung môi ethanol và nước của Bưởi bung chưa được định danh nhưng hàm lượng các chất polyphenol và flavonoid tổng số đã được xác định (bảng 1). Kết quả này cũng chứng minh cho sự tồn tại của các hợp chất thứ cấp và các chất này đóng vai trò là chất đối kháng trong lá của Bưởi bung làm ảnh hưởng tới quá trình nảy mầm và sinh trưởng của hai loài thực vật là Cải củ và Xà lách trong thí nghiệm.

Kết luận

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng số, hàm lượng và thành phần các chất có trong tinh dầu chiết xuất từ lá, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính đối kháng từ dịch chiết lá loài Bưởi bung đã được xác định trong nghiên cứu này. Việc sử dụng dung môi ethanol 70% có thể đạt hiệu quả chiết cao hơn ethanol 100%, tuy nhiên hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá bằng dung môi ethanol 100% lại cao hơn dịch chiết bằng dung môi ethanol 70%. Dịch chiết từ lá Bưởi bung cho thấy hoạt tính đối kháng đối với hai loài Cải củ và Xà lách. Điều này được thể hiện thông qua việc dịch chiết làm giảm tỷ lệ nảy mầm và ức chế sinh trưởng đối với Cải củ và Xà lách. Hàm lượng tinh dầu của lá Bưởi bung xác định được là 0,09% v/w trọng lượng khô với 33 hợp chất được tìm thấy bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ. Caryophyllene (47,09%), humulene (17,28%), α -copaene (4,98%), isodene (3,59%) và (-)- α -panasinsen (3,51%) là các hợp chất chính có trong tinh dầu. Kết quả của nghiên cứu đã bước đầu khẳng định Bưởi bung là loài tiềm năng có thể cung cấp nguyên liệu trong công nghiệp dược hay nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Lê Đình Mối (Chủ biên), Trần Minh Hợi, Dương Đức Huyền, Trần Huy Thái, Ninh Khắc Bản (2005), *Tài nguyên thực vật Việt Nam: những cây chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[2] J.J. Brophy, R.J. Goldsack, P.I. Forster (2004), "Leaf essential oils of the Australian species of *Acronychia* (Rutaceae)", *Journal Essential oil Research*, **16**(6), pp.597-607.

[3] W. Han, et al. (2004), "Isolation of high purity 1-[2',4'-dihydroxy-3',5'-di-(3"-methylbut-2"-enyl)-6'-methoxy] phenylethanone from *Acronychia pedunculata* (L.) by high-speed counter-current chromatography", *Journal of Chromatography A*, **1022** (1-2), pp.213-216.

[4] R.D.N. Karunathilaka, et al. (2016), "In vitro antibacterial activity of hexane, chloroform and methanolic extracts of different parts of *Acronychia pedunculata* grown in Sri Lanka", *International Journal of Advanced Research (IJAR)*, **4**(8), pp.1574-1579.

[5] T.D. Xuan, T.N. Minh, K.H. Trung, T.D. Khanh (2016), "Allelopathic potential of sweet potato varieties to control weeds: *Imperata cylindrica*, *Bidens pilosa* and *Ageratum conyzoides*", *Allelopathy Journal*, **38**(1), pp.41-54.

[6] V.L. Singleton, et al. (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", *Methods in Enzymology*, **299**, pp.152-178.

[7] G.C. Bag, et al. (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), pp.54-159.

[8] P.T. Tuyen, et al. (2018), "Weed suppressing potential and isolation of potent plant growth inhibitors from *Castanea crenata*", *Molecules*, **23**, p.345.

[9] Hồ Lệ Thi và cs (2016), *Kết quả chiết xuất và định danh chất đối kháng cỏ dại N-trans-Cinnamoyl tyramine từ giống lúa OM 5930*, Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ hai.

[10] A. Yadav, et al. (2016), "Antioxidants and its functions in human body - A review", *Research in Environment and Life Sciences*, **9**(11), pp.1328-1331.

[11] Đái Thị Xuân Trang, Võ Thị Tú Anh, Lâm Hồng Bảo Ngọc (2015), "Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hóa của cao methanol cây Hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juvenas* Merr.)", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường*, **40**, tr.1-6.

[12] D. Lesueur, et al. (2008), "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. from Vietnam", *Natural Product Research*, **22**(5), pp.393-398.

[13] T.D. Khanh, et al. (2006), "Weed suppression by *Passiflora edulis* and its potential allelochemicals", *European Weed Research Society*, **46**, pp.296-303.

[14] S.U. Chon, C.J. Nelson (2010), "Allelopathy in compositae plants", *Agronomy for Sustainable Development*, **30**, pp.349-358.

[15] H. Yoshimura, et al. (2011), "1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells", *Journal of Chemical Ecology*, **37**, pp.320-328.

[16] F. Deba, et al. (2007), "Herbicidal and fungicidal activities and identification of potential phytotoxins from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff", *Weed Biology and Management*, **83**, pp.77-83.

[17] Z.H. Li, et al. (2010), "Phenolics and plant allelopathy", *Molecules*, **15**, pp.8933-8952.