

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA *IN VITRO* CỦA CAO CHIẾT TOÀN PHẦN VÀ CÁC CAO CHIẾT PHÂN ĐOẠN TỪ VỎ QUẢ LỰU (*PUNICA GRANATUM L.*)

La Hồng Ngọc¹, Lý Hải Triều², Lâm Cẩm Tiên³, Lê Thị Thu Hương¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Sàng lọc dược liệu và các hợp chất tự nhiên có tác dụng chống oxy hóa ngày càng được quan tâm. Vỏ quả Lựu (*Punica granatum L.*) là một vị thuốc được sử dụng trong đông y và đang được quan tâm nghiên cứu.

Mục tiêu: Nghiên cứu này được thực hiện để sơ bộ thành phần hóa thực vật và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết từ vỏ quả Lựu.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Vỏ quả Lựu được phân tích thành phần hóa thực vật bằng các phản ứng hóa học, xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần bằng phương pháp đo quang. Bột nguyên liệu khô được chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt với ethanol 45% thu cao toàn phần và chiết lỏng-lỏng thu các cao phân đoạn. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá bằng các mô hình thử nghiệm *in vitro* bao gồm bắt gốc tự do DPPH, ABTS và tổng năng lực khử.

Kết quả: Vỏ quả Lựu có chứa triterpenoid tự do, alkaloid, coumarin, anthraglycosid, flavonoid, anthocyanosid, proanthocyanidin, tannin, triterpenoid thủy phân, saponin, acid hữu cơ và hợp chất khử. Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong cao toàn phần lần lượt là 191,49 mg GAE/g d. w. và 9,80 mg QE/g d. w., cao hơn đáng kể so với nguyên liệu khô. Cao toàn phần và các cao phân đoạn từ vỏ quả Lựu có hoạt tính chống oxy hóa. Trong đó, cao phân đoạn ethyl acetat có hiệu quả bắt gốc tự do DPPH ($IC_{50} = 1,81 \mu\text{g/ml}$), ABTS ($IC_{50} = 1,65 \mu\text{g/ml}$) và tổng năng lực khử ($EC_{50} = 4,88 \mu\text{g/ml}$) cao nhất và cao hơn vitamin C.

Kết luận: Vỏ quả Lựu chứa các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có khả năng chống oxy hóa có tiềm năng trong nghiên cứu và phát triển sản phẩm.

Từ khóa: Vỏ quả Lựu, thành phần hóa thực vật, polyphenol, flavonoid, chống oxy hóa

ABSTRACT

INVESTIGATING THE *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT AND ITS FRACTIONS OF POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM L.*) FRUIT PEELS

La Hong Ngoc, Ly Hai Trieu, Lam Cam Tien, Le Thi Thu Huong
* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 4 - 2021: 68 - 76

Background: Screening of medicinal materials and natural compounds that effectively antioxidant is gaining increasing attention. Pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels are a material used in oriental medicine and currently interested in research.

Objectives: This study was undertaken for preliminary phytochemical screening and evaluating of antioxidant activity of pomegranate fruit peel extracts.

Methods: Pomegranate fruit peels were analyzed phytochemicals by chemical reactions, quantified total polyphenol and flavonoid contents by spectrophotometric method. Dried powdered material was extracted through

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh - Viện Dược liệu

³Khoa Y học Cổ truyền - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: ThS. Lý Hải Triều

ĐT: 0932046948

Email: lhtrieu12csh@gmail.com

percolation methods with 45% ethanol to obtain crude extract and liquid-liquid extraction methods to gain its fractions. The antioxidant activity was evaluated by *in vitro* models including DPPH radical scavenging, ABTS radical cation decolorization, and reducing power assays.

Results: Pomegranate fruit peels contain free triterpenoids, alkaloids, coumarins, anthraglycosids, flavonoids, anthocyanosids, proanthocyanidins, tannins, triterpenoids after hydrolysis, saponins, organic acids, and reducing agents. Total polyphenol and flavonoid contents of crude extract are 191.49 mg GAE/g d. w. and 9.80 mg QE/g d. w., respectively, which are significantly higher than dried powdered material. Crude and fractionated extracts of pomegranate fruit peels had antioxidant activity. In particular, ethyl acetate fraction had the highest effectively scavenged free radicals of DPPH ($IC_{50} = 1.81 \mu\text{g/mL}$), ABTS ($IC_{50} = 1.65 \mu\text{g/mL}$) and reducing power ($EC_{50} = 4.88 \mu\text{g/ml}$), which is higher than vitamin C.

Conclusion: Pomegranate fruit peels contain secondary metabolites with antioxidant capacity and have potential in research and product development.

Keywords: Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels, phytochemicals, polyphenols, flavonoids, antioxidant

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự hình thành quá mức các gốc tự do vượt khả năng trung hòa của hệ thống phòng chống oxy hóa của cơ thể sẽ dẫn đến tình trạng stress oxy hóa và là nguyên nhân chính của nhiều bệnh lý mạn tính và thoái hóa ở người⁽¹⁾. Chất chống oxy hóa tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường sức khỏe, ngăn ngừa bệnh tật và hỗ trợ điều trị bệnh cho con người, ngày càng được chú ý bởi vì chúng không hoặc ít tác dụng phụ hơn so với chất chống oxy hóa ngoại sinh tổng hợp⁽²⁾. Trong đó, các dược liệu giàu polyphenol và flavonoid được công nhận có tác dụng chống oxy hóa mạnh^(1,2).

Vỏ quả Lựu (*Punica granatum* L.) là một vị thuốc trong đông y với tên gọi là thạch lựu bì với một số công dụng như thu liễm, chỉ tả, chỉ huyết, khu trùng, kháng virus, chống u, bứu⁽³⁾. Hiện nay, có nhiều nghiên cứu về vỏ quả Lựu vì có nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, chống ung thư, chống viêm, thúc đẩy lành vết thương, điều hòa đường huyết, bảo vệ gan, thận, cải thiện thoái hóa thần kinh, kháng khuẩn, kháng nấm, chống tia UV, giảm lipid máu, chống xơ vữa động mạch^(4,5). Các tác dụng này được cho là nhờ sự hiện diện của các hợp chất chuyển hóa thứ cấp với tác dụng sinh học được xác định có trong vỏ quả Lựu như polyphenol (flavonoid, tannin như pelargonidin, delphinidin, catechin,

epicatechin, quercetin, rutin, ellagitannin, acid ellagic, punicalagin, punicalin, pedunculagin, các acid phenolic như chlorogenic, caffeic, syringic, sinapic, *p*-coumaric, ferulic, ellagic, acid gallic và cinnamic)⁽⁶⁾, alkaloid, saponin và terpenoid⁽⁷⁻⁹⁾. Tại Việt Nam, một số bộ phận của cây Lựu cũng được nghiên cứu. Cao phân đoạn ethyl acetat và butanol từ quả Lựu có tác động đánh bắt gốc tự do DPPH, ức chế tyrosin phosphatase 1B⁽¹⁰⁾; cao chiết từ vỏ quả Lựu thu tại thành phố Hồ Chí Minh có tác động bắt gốc tự do DPPH, ức chế peroxy hóa màng tế bào *in vitro* và không thể hiện độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng⁽⁸⁾; cao chiết từ vỏ quả Lựu có phổ kháng khuẩn rộng, kháng 4/5 chủng vi khuẩn thử nghiệm và nấm *Candida albicans*⁽¹¹⁾. Mặc dù, vỏ quả Lựu được chứng minh có nhiều giá trị sử dụng nhưng phần lớn hiện nay vẫn là bộ phận không được sử dụng sau khi thu dịch ép hoặc hạt. Để cung cấp thêm thông tin về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của vỏ quả Lựu tại Việt Nam, góp phần làm tăng giá trị sử dụng của nguyên liệu này, nghiên cứu này thực hiện phân tích sơ bộ thành phần hóa học thực vật, định lượng polyphenol và flavonoid toàn phần, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ cao chiết toàn phần từ vỏ quả Lựu thu tại An Giang, định hướng nghiên cứu tiếp theo.

ĐỐI TƯỢNG – PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thực vật được định danh bởi Bộ môn Tài nguyên – Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. HCM dựa trên kết quả phân tích mẫu tiêu bản thực vật so sánh với các tài liệu chuyên môn^(12,13), tên khoa học của mẫu thực vật được hiệu chỉnh theo hệ thống danh pháp quốc tế⁽¹⁴⁾. Tên khoa học của mẫu nghiên cứu được xác định là *Punica granatum* L. thuộc họ Lựu Punicaceae.

Quả Lựu chín, không sâu bệnh được thu vào tháng 2 năm 2020 tại An Giang. Quả được làm sạch, loại bỏ phần thịt và hạt, lấy phần vỏ. Vỏ quả Lựu được phơi sấy khô theo quy định của Dược điển Việt Nam V về dược liệu khô (Độ ẩm hay mất khối lượng do làm khô <13%) và xay nhỏ qua rây với kích thước lỗ 2 mm để nghiên cứu. Mẫu dược liệu khô hiện được lưu giữ tại Bộ môn Y học Cơ sở, Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành (Mã số lưu mẫu: NTT-DL-VQL-0220).

Hóa chất – thuốc thử

Ethanol 96% (Công ty Cổ phần Dược phẩm OPC); *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat, *n*-butanol (VN-Chemsol, Co. Ltd); nhôm clorua, methanol, quercetin và acid gallic (HPLC ≥ 98%), Folin-Ciocalteu's phenol, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), kali ferricyanua, acid trichloroacetic và vitamin C được mua từ Sigma-Aldrich® Co. Ltd (USA).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế thực nghiệm, đo lường độc lập.

Chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn

Bột vỏ quả Lựu (1000g, độ ẩm 9,9%) được chiết bằng phương pháp ngâm kiệt với ethanol 45% ở nhiệt độ phòng. Tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/15 (g/ml), thời gian ngâm chiết là 24 giờ, tốc độ rút 2 ml/phút. Tập trung toàn bộ dịch chiết, cô quay chân không dưới áp suất giảm ở 60 °C thu được cao loãng. Cao loãng tiếp tục được cô

trên bếp cách thủy ở 60 °C thu được cao chiết toàn phần (Cao T, độ ẩm 14,3%, hiệu suất 59,7%). Cao toàn phần được thêm nước cất và chiết phân bố lỏng-lỏng lần lượt với các dung môi *n*-hexan, cloroform, ethyl acetat và *n*-butanol, sau đó loại dung môi để thu phân đoạn cao chiết *n*-hexan (Cao F1, hiệu suất 0,3%), cao cloroform (Cao F2, hiệu suất 7,6%), cao ethyl acetat (Cao F3, hiệu suất 9%), cao *n*-butanol (Cao F4, hiệu suất 21,1%) và phần còn lại là cao nước (Cao F5, hiệu suất 52,6%).

Sơ bộ phân tích thành phần hóa học thực vật

Các dịch chiết từ vỏ quả Lựu được kiểm tra sự hiện diện của một số hợp chất chuyển hóa thứ cấp theo quy trình của Bộ môn Dược liệu, trường ĐH Y Dược TP. HCM từ phương pháp của Ciulei (1982) có sửa đổi⁽¹⁵⁾.

Định lượng polyphenol toàn phần

Hàm lượng polyphenol toàn phần được xác định bằng phương pháp đo quang dựa trên phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu sử dụng acid gallic làm chất chuẩn⁽¹⁶⁾. Dịch thử được chuẩn bị như sau: Chiết 1 g nguyên liệu bằng máy soxhlet đến kiệt polyphenol (Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng, dịch chiết không còn vết màu xanh đen khi phun với thuốc thử FeCl₃ 5% trong ethanol), dịch chiết methanol được cô quay thu hồi dung môi đến dịch lỏng và dịch lỏng được cô cách thủy đến cạn, cạn được hòa tan trong methanol ở độ pha loãng phù hợp để định lượng; đối với cao chiết toàn phần, hòa tan 0,05 g cao chiết trong methanol bằng máy siêu âm đến độ pha loãng phù hợp để định lượng. Hỗn hợp phản ứng gồm 200 µl dịch thử trộn với 6 ml nước cất 2 lần và 500 µl thuốc thử Folin-Ciocalteu. Sau 5 phút, 1,5 ml dung dịch natri carbonat (20% w/v) được thêm vào hỗn hợp và định mức đến 10 ml bằng nước cất 2 lần. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong bóng tối 2 giờ tại nhiệt độ phòng. Mật độ quang của hỗn hợp được đo ở bước sóng hấp thụ cực đại của chất chuẩn acid gallic bằng máy quang phổ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình. Hàm lượng polyphenol toàn phần được tính từ

phương trình đường chuẩn acid gallic và biểu thị bằng mg đương lượng acid gallic/g trọng lượng khô (mg GAE/g d. w.).

Định lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp đo quang dựa trên phản ứng với thuốc thử nhôm clorua sử dụng quercetin làm chất chuẩn⁽¹⁶⁾. Dung dịch quercetin chuẩn được pha bằng cách hòa tan 1,0 mg quercetin trong 10 ml methanol, sau đó dãy dung dịch làm việc quercetin chuẩn được pha loãng nối tiếp bằng methanol. Dịch thử được chuẩn bị như sau: Chiết 1 g nguyên liệu bằng máy soxhlet đến kiệt flavonoid (Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng tương tự như chiết polyphenol vì flavonoid thuộc nhóm polyphenol) hoặc hòa tan 0,1 g cao chiết toàn phần trong methanol bằng máy siêu âm, dịch chiết methanol được cô quay thu hồi dung môi đến dịch lỏng và dịch lỏng được cô cách thủy đến cạn, cặn được hòa tan trong 20 ml nước cất thu dịch nước. Dịch nước được loại tạp với diethyl ether đến khi lớp diethyl ether hết màu hoặc màu rất nhạt, gạn bỏ dịch diethyl ether (diethyl ether được thu hồi). Dịch nước tiếp tục được chiết với ethyl acetat đến khi kiệt flavonoid (Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng tương tự như chiết polyphenol). Toàn bộ dịch ethyl acetat thu được sau khi rửa với nước cất 3 lần, cô quay giảm áp thu hồi ethyl acetat thu được dịch lỏng, dịch lỏng được cô cách thủy đến cạn, cặn được hòa tan trong methanol đến độ pha loãng phù hợp để định lượng. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch thử hoặc dung dịch quercetin chuẩn được trộn với 1 ml nhôm clorua 2% và định mức đến 10 ml bằng methanol. Sau đó, hỗn hợp được trộn và ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Mật độ quang của hỗn hợp được đo ở bước sóng hấp thụ cực đại của chất chuẩn quercetin bằng máy quang phổ. Các phép đo được thực hiện trong ba lần. Hàm lượng flavonoid toàn phần được tính từ phương trình đường chuẩn quercetin và được biểu thị bằng mg đương lượng quercetin/g trọng lượng khô (mg QE/g d. w.).

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Thử nghiệm DPPH

Hỗn hợp phản ứng trong methanol bao gồm 0,5 ml cao chiết ở các nồng độ khác nhau phản ứng với đồng lượng dung dịch DPPH 0,6 mM pha trong methanol. Thêm methanol vừa đủ 4 ml. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 515 nm. Sử dụng mẫu trắng là methanol. Vitamin C được sử dụng làm chứng dương. Thực hiện lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu, lấy giá trị trung bình từng mẫu và tính toán⁽¹⁶⁾. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức: $I(\%) = [1 - ((A_1 - A_2)/A_0)] \times 100$. Trong đó: A_0 là mật độ quang của mẫu chứng (dung dịch DPPH, không có chất thử); A_1 là độ hấp thụ quang của mẫu có chứa chất thử và DPPH, A_2 là mật độ quang của mẫu có chứa chất thử, không có DPPH. Khả năng chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị IC_{50} (Nồng độ chất chống oxy hóa ức chế (trung hòa) 50% gốc tự do DPPH trong khoảng thời gian xác định). Giá trị IC_{50} được tính dựa theo phương trình thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và tỷ lệ phần trăm hoạt tính chống oxy hóa.

Thử nghiệm ABTS

Dung dịch ABTS được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS nồng độ 7 mM vào dung dịch kali persulfat 2,4 mM với thể tích bằng nhau rồi ủ dung dịch trong bóng tối 16 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch này sau đó được pha loãng bằng cách trộn 1 ml dung dịch ABTS với 50 ml methanol để thu được độ hấp thụ $0,706 \pm 0,01$ đơn vị ở 734 nm bằng máy đo quang phổ. Dùng dung dịch này cho thử nghiệm. Trộn 40 μ l mẫu thử ở các nồng độ khác nhau với 1160 μ l dung dịch ABTS, đo mật độ quang ở 734 nm sau 7 phút ở nhiệt độ phòng. Vitamin C được sử dụng làm chứng dương. Thực hiện 3 lần trên mỗi mẫu, lấy giá trị trung bình từng mẫu và tính toán⁽¹⁶⁾. Phần trăm bắt gốc tự do ABTS được tính theo công thức: $(\%) = [1 - ((A_1 - A_2)/A_0)] \times 100$. Trong đó: A_0 là mật độ quang của mẫu chứng (dung dịch ABTS, không có chất thử); A_1 là mật

độ quang của mẫu có chứa chất thử và ABTS, A₂ là mật độ quang của mẫu có chứa chất thử, không có ABTS. Khả năng chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀ (Nồng độ chất chống oxy hóa ức chế (trung hòa) 50% gốc tự do ABTS trong khoảng thời gian xác định). Giá trị IC₅₀ được tính dựa theo phương trình thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và tỷ lệ phần trăm hoạt tính chống oxy hóa.

Thử nghiệm tổng năng lực khử

Hỗn hợp gồm 0,2 ml mẫu thử trộn với 0,5 ml đệm phosphat 0,2 M, pH 6,6 và 0,5 ml kali ferricyanua 1%, ủ ở nhiệt độ 50 °C trong 30 phút. Sau khi làm mát, thêm vào 0,5 ml acid trichloroacetic 10% và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, 0,5 ml dịch nổi được thu, trộn với 0,5 ml nước cất và 0,1 ml dung dịch sắt (III) clorua 0,1% mới pha. Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 700 nm. Sử dụng mẫu trắng là nước cất hai lần. Vitamin C được sử dụng làm chứng dương. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình từng mẫu và tính toán⁽¹⁶⁾. Giá trị mật độ quang càng cao chứng tỏ năng lực

khử của mẫu càng cao. Đồng thời, khả năng chống oxy hóa của mẫu cũng được đánh giá thông qua giá trị EC₅₀ (Nồng độ chất chống oxy hóa ức chế cho mật độ quang đạt 0,5: OD_{0,5}) được tính dựa theo phương trình thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và mật độ quang của mẫu thử.

Xử lý số liệu

Số liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình Mean ± SEM (Standard error of the mean: sai số chuẩn của giá trị trung bình) và xử lý thống kê dựa vào phép kiểm t-test bằng phần mềm GraphPad (version 8, Inc., La Jolla, CA, USA).

KẾT QUẢ

Thành phần hóa thực vật

Phân tích thành phần hóa thực vật cho thấy vỏ quả Lựu có chứa các nhóm chất như triterpenoid tự do, alkaloid, coumarin, anthraglycosid, flavonoid, anthocyanosid, proanthocyanidin, tannin, triterpenoid thủy phân, saponin, acid hữu cơ và hợp chất khử (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật của vỏ quả Lựu

Nhóm hợp chất	Kết quả định tính trên các dịch chiết					Kết quả định tính chung
	Dịch chiết ether	Dịch chiết cồn		Dịch chiết nước		
		Không thủy phân	Thủy phân	Không thủy phân	Thủy phân	
Chất béo	-					-
Carotenoid	-					-
Tinh dầu	-					-
Triterpenoid tự do	+			-		+
Alkaloid	-	+		+		+
Coumarin	+	+	-	+		+
Anthraglycosid	-		+	-	+	+
Flavonoid	-	++++	++++	+++	++++	++++
Anthocyanosid		+		+		+
Proanthocyanidin		+		+		+
Tannin		++		++		++
Triterpenoid thủy phân			+		+	+
Saponin		++		++		++
Acid hữu cơ		-		+		+
Chất khử		+		+		+
Hợp chất polyuronic				-		-

(-): Không phát hiện, (+): Có ít, (++) : Có, (+++) : Có nhiều, (++++): Có rất nhiều, (Ô trống): Có thể có nhưng không thực hiện

Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần

Nghiên cứu này tập trung đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết từ vỏ quả Lựu thu tại An Giang. Do đó, hàm lượng của các nhóm hợp chất (polyphenol và flavonoid) có thể góp phần vào khả năng chống oxy hóa của vỏ quả Lựu được xác định. Dựa vào kết quả khảo sát trước đây của nhóm nghiên cứu⁽⁸⁾, quercetin và acid gallic được sử dụng làm chất chuẩn định lượng tương ứng cho flavonoid và polyphenol toàn phần. Kết quả từ *Bảng 2* cho thấy giá trị trung bình của hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần tính theo phương trình hồi quy của chất chuẩn tương ứng trong cao chiết toàn phần cao hơn đạt ý nghĩa thống kê so với nguyên liệu.

Bảng 2. Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong nguyên liệu và cao chiết toàn phần từ vỏ quả Lựu (N = 3)

Kết quả	Hàm lượng toàn phần	
	Polyphenol (mg GAE/g d. w.), λ _{max} = 758 nm	Flavonoid (mg QE/g d. w.), λ _{max} = 454 nm
Phương trình đường chuẩn	y = 0,0097x - 0,0278 (R ² = 0,997)	y = 0,0219x - 0,0554 (R ² = 0,998)
Nguyên liệu	80,01 ± 0,18	2,88 ± 0,02
Cao chiết	191,49 ± 0,34*	9,80 ± 0,07*

*p < 0,05 khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với nguyên liệu.

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn từ vỏ quả Lựu

Các cao chiết từ vỏ quả Lựu được đánh giá hoạt tính chống oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS và tổng năng lực khử. Kết quả được trình bày ở *Hình 1*.

Kết quả cao chiết toàn phần và tất cả các cao chiết phân đoạn từ vỏ quả Lựu đều thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do DPPH ở các nồng độ khảo sát. Trong đó, cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn ethyl acetat, n-butanol và nước có hoạt tính tốt hơn so với cao phân đoạn n-hexan và cloroform (*Hình 1A*). Một xu hướng tương tự cũng được phát hiện ở hoạt tính bắt gốc tự do ABTS và tổng năng lực khử.

Kết quả thu được ở hoạt tính bắt gốc tự do ABTS và tổng năng lực khử của các cao chiết từ

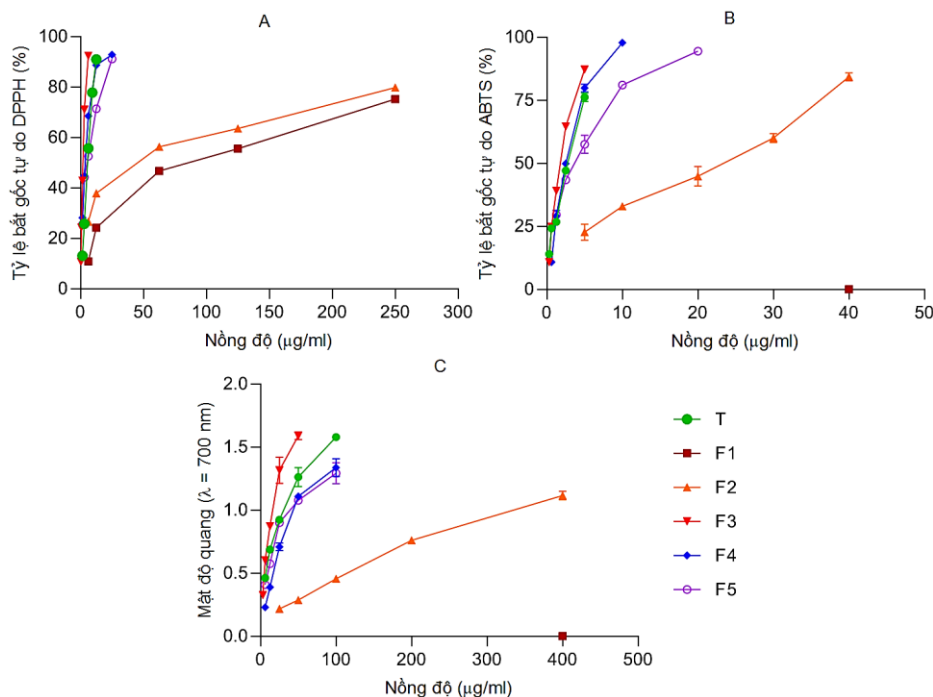
vỏ quả Lựu cho thấy cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn ethyl acetat, n-butanol và nước có hoạt tính tốt hơn so với cao phân đoạn cloroform. Cao phân đoạn n-hexan không thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do ABTS và tổng năng lực khử ở nồng độ khảo sát cao nhất trong từng thử nghiệm (*Hình 1B* và *Hình 1C*). Trong cả hai thử nghiệm, nồng độ phản ứng của cao phân đoạn n-hexan đã được tăng lên đến gấp đôi nồng độ cao nhất của cao phân đoạn cloroform vẫn không thể hiện hoạt tính. Do đó, cao phân đoạn n-hexan sẽ không được xác định giá trị IC₅₀ và EC₅₀.

Khả năng chống oxy hóa của các cao chiết từ vỏ quả Lựu ở các thử nghiệm còn được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀/EC₅₀. Giá trị IC₅₀/EC₅₀ càng thấp thì khả năng chống oxy hóa càng mạnh. Kết quả từ *Bảng 3* cho thấy giá trị IC₅₀ trong thử nghiệm DPPH, ABTS và giá trị EC₅₀ trong thử nghiệm tổng năng lực khử theo thứ tự tương ứng là F3<F4<F5<VitC<T<F2<F1, F3<F4<T<F5<VitC<F2 và F3<VitC<T<F5<F4<F2. Cao phân đoạn ethyl acetat (F3) thể hiện hoạt tính trong ba thử nghiệm này rất mạnh và hiệu quả hơn cả thuốc đối chiếu vitamin C (VitC) (*Bảng 3*). Bên cạnh đó, cao toàn phần, cao phân đoạn n-butanol và nước cũng có hoạt tính tốt hơn đáng kể so với vitamin C trong thử nghiệm ABTS.

Bảng 3. Giá trị IC₅₀/EC₅₀ của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ vỏ quả Lựu ở các thử nghiệm (N = 3)

Cao chiết	IC ₅₀ (µg/ml)		EC ₅₀ (µg/ml)
	DPPH	ABTS	Tổng năng lực khử
T	5,53 ± 0,07*	2,65 ± 0,03*	7,59 ± 0,29*
F1	76,44 ± 0,69*	-	-
F2	37,98 ± 0,18*	19,78 ± 0,92*	126,08 ± 2,21*
F3	1,81 ± 0,01*	1,65 ± 0,04*	4,88 ± 0,13
F4	3,46 ± 0,02*	2,41 ± 0,05*	13,67 ± 0,5*
F5	4,82 ± 0,02*	3,35 ± 0,13*	8,55 ± 0,41*
VitC	4,20 ± 0,04	9,59 ± 0,90	4,91 ± 0,12

*p < 0,05 khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với vitC; T: Cao toàn phần, F1: Cao n-hexan, F2: Cao cloroform, F3: Cao ethyl acetat, F4: Cao n-butanol, F5: Cao nước, VitC: Vitamin C, (-): Không xác định



Hình 1. Hiệu quả chống oxy hóa của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ vỏ quả Lựu. A – Khả năng bắt gốc tự do DPPH, B – Khả năng bắt gốc tự do ABTS, C – Tổng năng lực khử. T: Cao toàn phần, F1: Cao n-hexan, F2: Cao cloroform, F3: Cao ethyl acetat, F4: Cao n-butanol, F5: Cao nước

BÀN LUẬN

Nghiên cứu và phát triển nguồn dược liệu trong kiểm soát, hỗ trợ điều trị bệnh và bảo vệ sức khỏe con người là xu hướng ngày càng được mở rộng trên toàn thế giới bởi sự hiện diện đa dạng các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có nhiều hoạt tính sinh học. Vỏ quả Lựu là bộ phận phần lớn không được sử dụng sau khi thu dịch ép hoặc hạt, chỉ dùng ít trong đông y nên nghiên cứu này đã tận thu vỏ quả để đánh giá khả năng chống oxy hóa định hướng nghiên cứu sản phẩm hỗ trợ sức khỏe. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật của vỏ quả Lựu được tận thu từ quả lựu thu tại An Giang tương đồng với một số công bố trước đây⁽⁶⁻⁹⁾ với sự hiện diện của polyphenol, flavonoid, alkaloid, coumarin, anthocyanosid, proanthocyanidin, tannin, triterpenoid, saponin. Những hợp chất thứ cấp này thể hiện nhiều hoạt tính sinh học, có tiềm năng trong trị liệu. Trong đó, các hợp chất polyphenol và flavonoid được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu cũng như ứng dụng trong

các lĩnh vực như dược phẩm, y tế và mỹ phẩm bởi các tác động có lợi đối với sức khỏe con người⁽¹⁷⁾. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy cao chiết có hàm lượng polyphenol toàn phần là 191,49 mg GAE/g trọng lượng khô và hàm lượng flavonoid toàn phần là 9,8 mg QE/g trọng lượng khô. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần của cao chiết từ vỏ quả Lựu thu tại An Giang cao hơn so với vỏ quả Lựu thu tại TP. Hồ Chí Minh⁽⁸⁾. Điều này cho thấy, tùy vùng có thổ nhưỡng, khí hậu hay các điều kiện ngoại cảnh khác có thể ảnh hưởng đến sự tích lũy của các hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong cây. Mặt khác, kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần cũng cao hơn so với một số công bố ngoài nước và hàm lượng flavonoid toàn phần có thể cao hơn hoặc thấp hơn tùy vào chất chuẩn lựa chọn để định lượng⁽¹⁸⁻²⁰⁾. So với cao chiết từ phần thịt và hạt thì cao chiết từ phần vỏ quả trong nghiên cứu này có hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần cao hơn⁽²¹⁾. Như vậy, kết

qua nghiên cứu cũng cho thấy tiềm năng nghiên cứu và phát triển của vỏ quả Lựu tại Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ vỏ quả Lựu được đánh giá bằng thử nghiệm bắt gốc tự do DPPH, ABTS và tổng năng lực khử. Kết quả chứng minh rằng cao chiết toàn phần từ vỏ quả Lựu có tác dụng chống oxy hóa dựa trên khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS và năng lực khử sắt. Kết quả thử nghiệm ABTS cho thấy có sự khác biệt đáng kể hoạt tính giữa cao toàn phần ($IC_5 = 2,65 \mu\text{g/ml}$) và vitamin C ($IC_5 = 9,59 \mu\text{g/ml}$), cho thấy cao toàn phần có hoạt tính bắt gốc tự do ABTS tốt hơn đáng kể so với vitamin C. Điều này có thể gợi ý rằng sự hiện diện của nhiều hợp chất có tác dụng chống oxy hóa, đặc biệt là các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid, đã góp phần làm tăng tác dụng cho cao chiết vỏ quả Lựu. Tuy nhiên, trong thử nghiệm DPPH và tổng năng lực khử, giá trị IC_{50}/EC_{50} của cao chiết toàn phần cao hơn đạt ý nghĩa thống kê so với vitamin C, cho thấy cao chiết toàn phần thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH và năng lực khử sắt còn yếu hơn so với vitamin C. Mặc dù vậy, khi so sánh tác dụng chống oxy hóa giữa cao chiết từ vỏ quả Lựu với một số cao chiết được liệu khác trên các thử nghiệm *in vitro* này cho thấy cao chiết từ vỏ quả Lựu có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn⁽²²⁾. Đối với hoạt tính các cao phân đoạn, ngoại trừ cao *n*-hexan không có hoạt tính chống oxy hóa trên cả 2 phương pháp đánh giá ABTS và tổng năng lực khử, các cao chiết phân đoạn như ethyl acetat, *n*-butanol và nước thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, ABTS cao và năng lực khử sắt tương đối tốt. Trong đó, cao phân đoạn ethyl acetat có hiệu quả chống oxy hóa tốt nhất với các giá trị IC_{50} rất thấp (1,81; 1,65 và 4,88 $\mu\text{g/ml}$) và tốt hơn nhiều lần so với vitamin C (4,2; 9,59 và 4,91 $\mu\text{g/ml}$). So với kết quả khảo sát trước đây của nhóm cho thấy vỏ quả Lựu thu tại TP. Hồ Chí Minh⁽⁸⁾ và An Giang có hoạt tính chống oxy hóa theo cơ chế bắt gốc tự do DPPH là tương đương nhau. Hơn nữa, kết

qua hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết vỏ quả Lựu trong nghiên cứu này cũng cao hơn so với một số công bố trước đây^(4,19) và cao hơn cao chiết từ phần thịt và hạt⁽²⁰⁾. Do đó, cao chiết vỏ quả Lựu tại Việt Nam, đặc biệt là cao phân đoạn ethyl acetat là cao chiết rất có triển vọng để nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Một trong những cơ sở tạo nên hoạt tính chống oxy hóa mạnh của cao chiết từ vỏ quả Lựu chính là sự tồn tại của polyphenol và flavonoid, chúng được coi là nguồn chất chống oxy hóa và bắt giữ các gốc tự do tốt. Như vậy, kết quả khảo sát đã góp phần cung cấp thêm thông tin về vỏ quả Lựu mọc tại An Giang là ứng cử viên có triển vọng cao để nghiên cứu phát triển sản phẩm phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến gốc tự do, phòng ngừa bệnh tật, tăng cường và bảo vệ sức khỏe con người.

KẾT LUẬN

Vỏ quả Lựu có chứa polyphenol và flavonoid, là những nhóm hợp chất chính. Hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần trong cao chiết toàn phần cao hơn đáng kể so với nguyên liệu khô. Cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ vỏ quả Lựu thể hiện hoạt tính chống oxy hóa theo cơ chế bắt gốc tự do DPPH, ABTS và năng lực khử. Trong đó, cao chiết phân đoạn ethyl acetat có hoạt tính cao nhất và cao hơn vitamin C. Do đó, vỏ quả Lựu là một dược liệu rất có tiềm năng cho nghiên cứu sâu hơn và ứng dụng phát triển sản phẩm.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Nguyễn Tất Thành đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này từ đề tài theo hợp đồng số 2020.01.089/HĐ-KHCN ký ngày 06/02/2020 của Hiệu trưởng Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13:757-772.
2. Fernandes RP, Trindade MA, Tonin FG, Lima CG, Pugine SM, Munekata PE, Lorenzo JM, de Melo MP (2016). Evaluation of

- antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *J Food Sci Technol*, 53(1):451-460.
3. Võ Văn Chi, Trần Hợp (2001). Cây có củ ích ở Việt Nam, pp.255. *Nhà Xuất Bản Giáo Dục*, TP. Hồ Chí Minh.
 4. Barathikannan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA, Agastian P, Arasu MV, Choi HS, Kim YO (2016). Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its *in vitro* and *in vivo* biological properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:264.
 5. Smaoui S, Hlima HB, Mtibaa AC, Fourati M, Sellem I, Elhadeif K, Ennouri K, Mellouli L (2019). Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. *Meat Science*, 107914.
 6. Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem*, 261: 75-86.
 7. Mayasankaravalli C, Deepika K, Lydia DE, Agada R, Thagriki D, Govindasamy C, Chinnadurai V, Gatar OMO, Khusro A, Kim YO, Kim HJ (2020). Profiling the phyto-constituents of *Punica granatum* fruits peel extract and accessing its *in-vitro* antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12):3228-3234.
 8. Lý Hải Triều, Võ Tuấn Anh, Nguyễn Việt Hồng Phong, Phạm Thị My Sa, Lâm Bích Thảo, Nguyễn Hoàng Lân, Lê Văn Minh (2019). Khảo sát thành phần hóa học, hoạt tính kháng oxy hóa và độc tính cấp đường uống của cao chiết từ vỏ quả lựu (*Punica granatum* L.). *Y Dược Học Đại học Y Dược Huế*, 4(9):7-14.
 9. Rana S, Dixit S, Mittal A (2017). Screening of phytochemicals and bioactive compounds in *Punica granatum* peel to evaluate its hematological potential. *Int J Cur Adv Res*, 6(3):2524-2529.
 10. Đặng Kim Thu, Nguyễn Lệ Quyên, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thanh Tùng (2019). Đánh giá tác dụng chống oxy hóa và khả năng ức chế enzym Protein tyrosin phosphatase 1B của các phân đoạn dịch chiết quả Lựu (*Punica granatum* Linn.). *Dược Học*, 516:54-56, 67.
 11. Mai Thị Trà Giang (2014). Khảo sát về mặt thực vật học và thử hoạt tính kháng khuẩn, chống nấm của các dịch chiết từ cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) và quả Lựu (*Punica granatum* L.). *Luận văn Thạc sĩ Sinh Học*. Trường Đại học Sư Phạm TP. Hồ Chí Minh.
 12. Phạm Hoàng Hộ (2003). *Cây cỏ Việt Nam, Quyển 2*. Nhà Xuất Bản Trẻ, TP. Hồ Chí Minh.
 13. Võ Văn Chi (2012). Từ điển cây thuốc Việt Nam, V1, pp 1371-1372. *Nhà Xuất Bản Y Học*, Hà Nội.
 14. The plant list/ URL: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2536844> (access on 15/7/2020).
 15. Trần Hùng (2011). Phương pháp nghiên cứu dược liệu: tài liệu lưu hành nội bộ, pp1-16. *Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh*. TP. Hồ Chí Minh
 16. Basu P, Maier C (2016). *In vitro* antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. *Pharmacognosy Research*, 8(4):258-264.
 17. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5: e47.
 18. AlRawahi AS, Edwards G, AlSibani M, AlThani G, Al-Harrasi AS, Rahman MS (2013). Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum* L.) cultivated in Oman. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(3):315-331.
 19. Yan L, Zhou X, Shi L, Shalimu D, Ma C, Liu Y (2017). Phenolic profiles and antioxidant activities of six Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *International Journal of Food Properties*, 20(S1):S94-S107.
 20. Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y, Nasri N, Ferchichi A (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(xx):4724-4730.
 21. Zeghad N, Ahmed E, Belkhir A, Heyden YV, Demeyer K (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5(4):e01575.
 22. Badami S, Channabasavaraj KP (2007). *In vitro* antioxidant activity of thirteen medicinal plants of India's Western Ghats. *Pharmaceutical Biology*, 45(5): 392-396.
- Ngày nhận bài báo: 14/01/2021
 Ngày phản biện nhận xét bài báo: 14/04/2021
 Ngày bài báo được đăng: 20/08/2021