

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYPHENOL, FLAVONOID VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT TỪ LÁ CHANH (CHI CAM CHANH – *Citrus*)

Nguyễn Chí Nguyễn, Ngô Thu Thảo,
Phùng Nguyễn Quốc Dinh, Văn Thị Mỹ Châu và Huỳnh Ngọc Trung Dung*
Khoa Dược – Điều Dưỡng, Trường Đại Học Tây Đô
(*Email: hntrungdung@gmail.com)

Ngày nhận: 15/3/2021

Ngày phản biện: 01/6/2021

Ngày duyệt đăng: 19/7/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết từ lá ba giống chanh: Chanh không hạt (*Citrus latifolia* Tanaka), chanh tàu (*Citrus limonia* Osbeck) và chanh giấy (*Citrus aurantifolia* (Christm et Panzer) Swingle). Dung môi được sử dụng là ethanol (96%, 50%) và nước cất theo các phương pháp Folin-Ciocalteu; Phương pháp so màu $AlCl_3$; DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) và FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power). Kết quả nghiên cứu cho thấy lá của 3 loại chanh có chứa polyphenol, flavonoid, saponin, anthraquinon và các chất khử. Mẫu cao chiết ethanol 96% của chanh tàu có hàm lượng polyphenol cao nhất và mẫu cao chiết ethanol 96% của chanh giấy có hàm lượng flavonoid cao nhất. Hoạt tính kháng oxy hóa cao nhất được xác định ở mẫu cao chiết ethanol 96% của chanh tàu với phương pháp DPPH, với phương pháp khử sắt mẫu cao chiết nước của chanh tàu có hoạt tính cao nhất.

Từ khóa: Flavonoid, hoạt tính kháng oxy hóa, lá chanh, polyphenol

Trích dẫn: Nguyễn Chí Nguyễn, Ngô Thu Thảo, Phùng Nguyễn Quốc Dinh và Huỳnh Ngọc Trung Dung, 2021. Khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết từ lá chanh (chi cam chanh – *Citrus*). Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 12: 238-251.

*Ths. Huỳnh Ngọc Trung Dung – Giảng viên Khoa Dược & Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô

1. GIỚI THIỆU

Cây chanh là một loài cây trồng quen thuộc ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long chủ yếu là 3 loài: Chanh không hạt (*Citrus latifolia* Tanaka), chanh tàu (*Citrus limonia* Osbeck), chanh giấy (*Citrus aurantifolia* (Christm et Panzer) Swingle) (Võ Văn Chi, 2018). Lá chanh có vị cay, ngọt, tính ôn, có tác dụng hòa đàm, chỉ khát, lý khí, khai vị và được dùng làm thuốc trị sốt rét, cảm cúm, hen phế quản, ho gà, bệnh ngoài da (Đỗ Huy Bích, 2006).

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, cây chanh được sử dụng rộng rãi nhờ vào đặc tính kháng khuẩn (Khan *et al.*, 2012) và kháng nấm (Balamurugan, 2014). Ngoài ra, cây chanh còn có khả năng chống tăng huyết áp (Souza, 2011), trị đái tháo đường (Karimi, 2014), chống ung thư (Narang, 2016), kháng viêm và chống oxy hóa (Reddy, 2012; Xi, 2017). Bên cạnh đó, cây chanh còn có thể bảo vệ gan (Gokulakrishnan, 2009), loãng xương (Shalaby, 2011), ngăn ngừa các bệnh về đường tiết niệu (Anggraini, 2015).

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chủ yếu chỉ khảo sát các hoạt tính trên tinh dầu và phát hiện có khả năng ức chế 5 chủng vi khuẩn bao gồm *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* và *Pseudomonas aeruginosa* (Ngo Thi To Quyen *et al.*, 2020). Nghiên cứu nhằm xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết từ lá ba giống chanh được trồng phổ biến ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long.

Kết quả nghiên cứu nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho nghiên cứu được liệt kê sau đây.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Ba giống chanh không hạt, chanh tàu, chanh giấy được trồng tự nhiên và thu hái lá ở quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ vào tháng 8 năm 2020. Lá chanh được rửa sạch, sấy khô và xay nhỏ. Phân tích mẫu được thực hiện tại phòng thực hành Hóa Sinh, phòng thực hành Dược Liệu và phòng thực hành Kiểm Nghiệm Trường Đại học Tây Đô.

2.2. Hóa chất, dung môi, thuốc thử

Dung môi chiết xuất dược liệu: Ethanol 96%, ethanol 50%, nước cất.

Thuốc thử định tính các hợp chất trong cao chiết: H₂SO₄ đđ, NaOH 10%, bột Mg HCl đđ, dd FeCl₃ 5%, chloroform...

Khảo sát hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các mẫu cao chiết: AlCl₃ 10%, NaNO₂ 10%, FeCl₃ 5%, HCl 10%, Na₂CO₃ 20%, acid gallic (Sigma), quercetin (Sigma), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck).

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma), methanol (Trung Quốc). Dung dịch đệm phosphat 0,2M (pH 6,6), kali ferricyanid 1%, acid trichloroacetic 10%, FeCl₃ 1%, chất đối chứng acid ascorbic (Bi).

2.3. Chiết cao và xác định hiệu suất chiết

Lá của ba giống chanh được chiết bằng phương pháp ngâm lạnh có hỗ trợ siêu âm với dung môi ethanol 96%, 50% và nước cất (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Quy trình chiết: Lá chanh (khô) được cho vào bình chứa thủy tinh, có nắp đậy. Rót dung môi chiết vào bình cho đến khi xấp bề mặt dược liệu, ngâm 30 phút, tiến hành đánh siêu âm trong 30 phút. Sau đó, dung dịch chiết được lọc qua giấy lọc; Cô đuôi dung môi sẽ có được cao chiết. Tiếp tục rót dung môi mới vào bình chứa chiết đến khi nhỏ dịch chiết lên lam kính, làm khô lam, nhìn không còn thấy vết để lại (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Dung dịch chiết được cô cách thủy ở nhiệt độ 60 °C đến khi đạt tiêu chuẩn cao đặc (độ ẩm cao ≤ 20%) theo Dược điển Việt Nam V, thu được các mẫu cao chiết.

Xác định độ ẩm cao chiết: Áp dụng phương pháp mất khối lượng do làm khô, dùng cân phân tích độ ẩm MB27 Ohaus. Trải cao thử nghiệm thành lớp mỏng trên đĩa cân (khoảng 0,5 g). Vận hành cân và ghi nhận độ ẩm với 3 lần lặp lại của mỗi mẫu.

Hiệu suất chiết cao: Hiệu suất chiết cao được tính dựa vào tỷ lệ giữa trọng lượng cao thu được so với lượng mẫu được sử dụng khi chiết.

Hiệu suất chiết cao được tính theo công thức

$$H = \frac{M_{\text{cao chiết}}}{M_{\text{mẫu dược liệu}}} \times 100\%$$

Trong đó: H: Hiệu suất cao (%)

$M_{\text{cao chiết}}$: Khối lượng cao (đã trừ ẩm) thu được sau khi cô đuôi dung môi (g).

$M_{\text{mẫu dược liệu}}$: Khối lượng dược liệu (đã trừ ẩm) đem chiết (g).

2.4. Định tính một số hợp chất tự nhiên

Phương pháp định tính được thực hiện theo mô tả của Sofowara *et al.* (1993) và Tiwari *et al.* (2011) và Ciuley có cải tiến của Trần Hùng (2014).

2.5. Định lượng hàm lượng polyphenol toàn phần

Nguyên tắc: Xác định hàm lượng polyphenol được thực hiện theo phương pháp Folin-Ciocalteu được mô tả bởi Feduraev *et al.* (2019) với một số hiệu chỉnh. Trong thành phần thuốc thử Folin-Ciocalteu có phức hợp phospho-wolfram-phosphomolybdat. Phức hợp này sẽ bị khử bởi các hợp chất polyphenol tạo thành sản phẩm phản ứng có màu xanh dương, hấp thụ cực đại ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng polyphenol có trong mẫu tỉ lệ thuận với cường độ mẫu.

Tiến hành phân tích: Pha loãng các mẫu cao chiết bằng methanol để đạt nồng độ 0,5 mg/mL và dung dịch chuẩn acid gallic ở các nồng độ 0; 50; 100; 150; 200 µg/mL. Hút 0,1 mL thể tích mẫu cần xác định (mẫu chuẩn acid gallic hoặc mẫu thử) cho vào bình định mức 10 mL. Ở mẫu trắng, thay mẫu bằng nước cất. Thêm vào 0,3 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 0,2 M. Lắc đều, ủ tối trong 10 phút. Tiếp theo thêm 6 mL dung dịch Na₂CO₃ 6,75%. Lắc đều, ủ tối 30 phút.

Độ hấp thu (Abs) của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 765 nm ở nhiệt độ phòng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị Abs được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để xác định hàm lượng polyphenol trong mẫu cao chiết. Hàm lượng polyphenol của cao chiết được tính dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic $y = ax + b$.

2.6. Định lượng hàm lượng flavonoid toàn phần

Nguyên tắc: Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ trong môi trường kiềm được mô tả bởi Marinova *et al.* (2005) với một số hiệu chỉnh. Pha loãng các mẫu cao chiết bằng methanol để đạt nồng độ 1 mg/mL và dung dịch chuẩn quercetin ở các nồng độ 25; 50; 75; 100; 125; 150 $\mu\text{g/mL}$.

Tiến hành phân tích: Hút 1 mL thể tích mẫu cần xác định (mẫu chuẩn quercetin hoặc mẫu thử) cho vào bình định mức 10 mL. Ở mẫu trắng, thay mẫu bằng nước cất. Thêm vào mẫu với 4 mL nước cất. Sau đó, thêm 0,3 mL $NaNO_2$ 10%. Lắc đều, để yên. Sau 5 phút, cho thêm vào 0,3 mL $AlCl_3$ 10%. Lắc đều, để yên. Sau 6 phút, cho tiếp vào 2 mL NaOH 1M và 2,4 mL nước cất. Lắc đều, để yên 10 phút. Độ hấp thu (Abs) của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm ở nhiệt độ phòng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị Abs được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để xác định hàm lượng flavonoid trong mẫu cao chiết. Hàm lượng flavonoid của cao chiết được

tính dựa trên phương trình đường chuẩn quercetin $y = ax + b$.

2.7. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

2.7.1. Phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH

Khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao được đánh giá thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH theo phương pháp (Chanda and Dave, 2009). Dung dịch DPPH nồng độ 0,6 mM, các mẫu cao chiết hòa tan với methanol để đạt nồng độ ban đầu 2.000 $\mu\text{g/mL}$, đối chứng dương acid ascorbic nồng độ 10; 20; 30; 40; 50 $\mu\text{g/mL}$ được pha loãng bằng methanol. Các mẫu thử được tiến hành khảo sát ở 5 nồng độ và lặp lại 3 lần.

Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch thử với 5 nồng độ thử vào ống nghiệm đã có sẵn 3 mL MeOH, tiếp theo đó là 0,5 mL dung dịch DPPH 0,6 mM. Đối với mẫu đối chứng thì thay dung dịch thử bằng MeOH, ống nghiệm của mẫu trắng chỉ chứa MeOH.

Các ống nghiệm sau khi pha được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 30 phút, sau đó đo độ hấp thu ở bước sóng 517 nm.

Hoạt tính kháng oxy hóa (%) = $((A_c - A_t) / A_c) \times 100$

Trong đó:

A_c : Giá trị hấp thu quang phổ của mẫu đối chứng;

A_t : Giá trị hấp thu quang phổ của mẫu thử.

Từ kết quả tính được và nồng độ mẫu, tiến hành vẽ phương trình đường thẳng

tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính kháng oxy hóa để tính IC₅₀. Giá trị IC₅₀ càng thấp tương ứng với hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại.

2.7.2 Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp khử sắt (FRAP-Ferric ion reducing antioxidant power)

Phương pháp khử sắt dựa trên nguyên tắc khi có sự hiện diện của chất kháng oxy hóa thì K₃Fe(CN)₆ sẽ phản ứng với chất kháng oxy hóa tạo thành phức K₄Fe(CN)₆. Sau đó, K₄Fe(CN)₆ tiếp tục phản ứng với FeCl₃ tạo thành KFe[Fe(CN)₆] phức này được phát hiện ở bước sóng 700 nm (Vijayalakshmi and Ruckmani, 2016).

Phương pháp được tiến hành theo mô tả của (Vijayalakshmi and Ruckmani, 2016) và một số cải tiến như sau: Các mẫu cao chiết hòa tan với nước cất để đạt nồng độ ban đầu 150 µg/mL, các mẫu thử được tiến hành khảo sát với 5 nồng độ, đối chứng dương acid ascorbic đạt nồng độ 3; 4,5; 6, 7,5; 9 µg/mL. Lần lượt lấy 1 mL dung dịch thử (hoặc acid ascorbic) ở mỗi nồng độ làm thử nghiệm. Đối với mẫu đối chứng thì thay dung dịch thử bằng nước cất. Cho thêm 2,5 mL dung dịch đệm phosphat pH = 6,6 và 2,5 mL dung dịch K₃Fe(CN)₆ 1%. Lắc mạnh, ủ ở 50 °C. Sau 20 phút, làm nguội ở nhiệt độ phòng. Thêm tiếp 2,5 mL dung dịch TCA 10%, đánh ly tâm 3.000 vòng/10 phút.

Tiếp theo, hút lấy 2,5 mL dung dịch sau ly tâm, cho thêm 2,5 mL nước cất và 0,5 mL dung dịch FeCl₃ 1%. Lắc đều, ủ

tối trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ (Abs) được ghi lại ở bước sóng 700 nm.

$$\text{Hoạt tính kháng oxy hóa (\%)} = ((A_t - A_c) / A_t) \times 100$$

Trong đó:

A_c: Giá trị hấp thụ quang phổ của mẫu đối chứng;

A_t: Giá trị hấp thụ quang phổ của mẫu thử.

Từ kết quả tính được và nồng độ mẫu, tiến hành vẽ phương trình đường thẳng tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và hoạt tính kháng oxy hóa để tính EC₅₀. Giá trị EC₅₀ càng thấp tương ứng với hoạt tính kháng oxy hóa càng cao và ngược lại. Các số liệu kết quả thử nghiệm được biểu thị trung bình qua 3 lần đo khác nhau.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ 100 g dược liệu mỗi mẫu ban đầu, sau khi chiết với các dung môi khảo sát thu được các cao tương ứng có hiệu suất chiết và độ ẩm của các cao qua Bảng 1. Kết quả cho thấy các cao chiết có độ ẩm nhỏ hơn 20% đạt tiêu chuẩn cao đặc, riêng mẫu cao chiết CG96 đạt tiêu chuẩn cao khô theo Dược điển Việt Nam V có thể tiến hành thử hoạt tính của các mẫu cao thử nghiệm. Hiệu suất chiết của dung môi ethanol 50% là cao nhất và dung môi ethanol 96% là thấp nhất. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy, lá chanh không hạt và chanh tàu có hiệu suất chiết cao hơn so với lá chanh giấy.

Bảng 1. Kết quả hiệu suất và độ ẩm cao

Mẫu	Khối lượng cao (g)	Độ ẩm cao (%)	Hiệu suất (%)
KH96	26,10	11,72	25,16
KH50	33,69	12,80	32,08
KHH ₂ O	32,40	11,45	31,32
CT96	23,53	8,95	23,38
CT50	31,82	10,83	30,39
CTH ₂ O	31,62	15,05	29,31
CG96	13,40	4,39	13,91
CG50	28,40	6,55	28,82
CGH ₂ O	23,61	13,42	22,19

**Chú thích:* KH96: Chanh không hạt chiết với ethanol 96%; KH50: Chanh không hạt chiết với ethanol 50%; KHH₂O: Chanh không hạt chiết với nước cất; CT96: Chanh tàu chiết với ethanol 96%; CT50: Chanh tàu chiết với ethanol 50%; CTH₂O: Chanh tàu chiết với nước cất; CG96: Chanh giấy chiết với ethanol 96%; CG50: Chanh giấy chiết với ethanol 50%; CGH₂O: Chanh giấy chiết với nước cất.

3.2. Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên

Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên của các cao chiết được thể hiện qua Bảng 2. Nhìn chung lá của 3 giống chanh chiết với 3 loại dung môi hầu hết đều có chứa polyphenol, flavonoid, saponin, anthraquinon, các chất khử. Riêng mẫu CT96 không có saponin và mẫu CG96

không có anthraquinon. Nghiên cứu của Al-Namani *et al.*, (2018) cho thấy lá chanh giấy trồng ở Oman có chứa các nhóm hợp chất sau: Tannin, steroid, flavonoid, alkaloid, carbohydrat nhưng protein và saponin không được tìm thấy. Sự khác biệt thành phần hóa học này do điều kiện thổ nhưỡng, cây giống và kỹ thuật canh tác nơi cây phát triển (Rajesh *et al.*, 2010).

Bảng 2. Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên

Nhóm hợp chất	Kết quả định tính								
	KH 96	KH 50	KH H ₂ O	CT 96	CT 50	CT H ₂ O	CG 96	CG 50	CG H ₂ O
Polyphenol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Anthraquinon	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Các chất khử	+	+	+	+	+	+	+	+	+

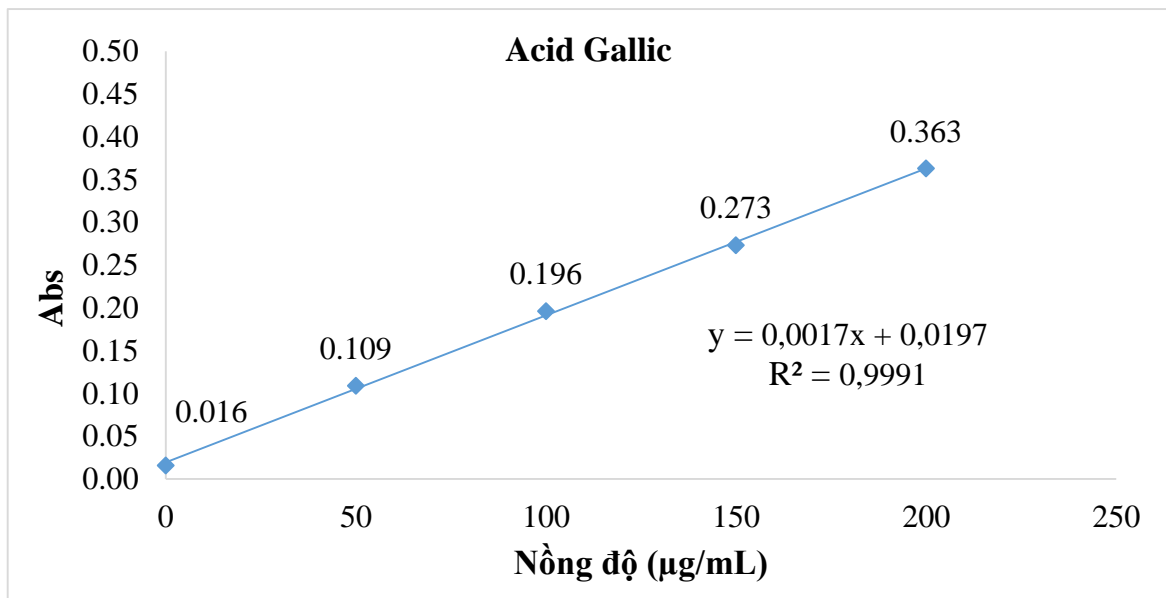
**Chú thích:* KH96: Chanh không hạt chiết với ethanol 96%; KH50: Chanh không hạt chiết với ethanol 50%; KHH₂O: Chanh không hạt chiết với nước cất; CT96: Chanh tàu chiết với ethanol 96%; CT50: Chanh tàu chiết với ethanol 50%; CTH₂O: Chanh tàu chiết với nước cất; CG96: Chanh giấy chiết với ethanol 96%; CG50: Chanh giấy chiết với ethanol 50%; CGH₂O: Chanh giấy chiết với nước cất.

3.3. Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần

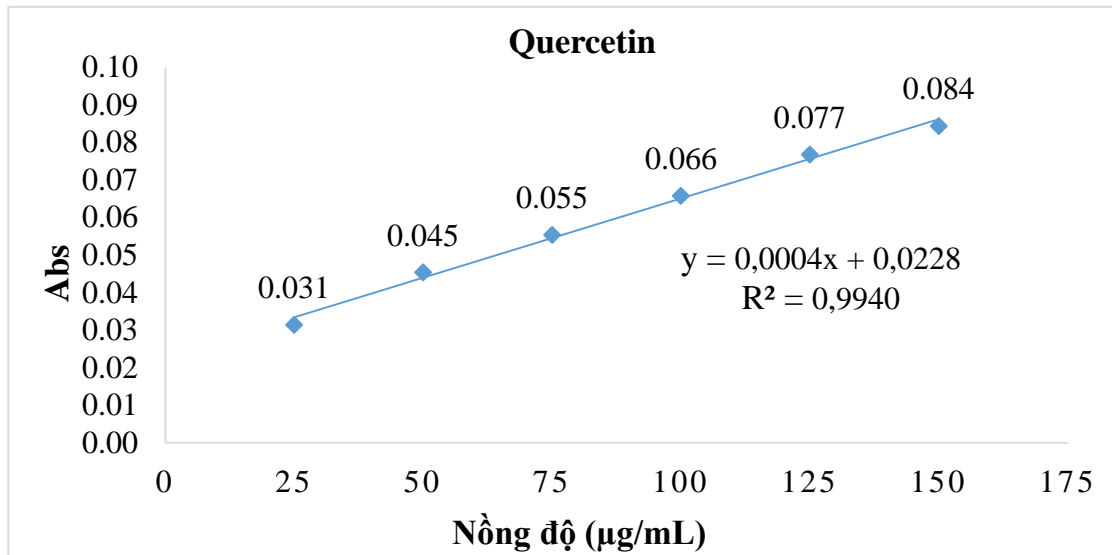
Các hợp chất polyphenol và các hợp chất flavonoid là những thành phần quan trọng và chiếm tỷ lệ cao trong đa số các loài thực vật. Những nhóm hợp chất này đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ sức khỏe cho con người. Vì vậy, chỉ tiêu này rất cần thiết trong bước đầu nghiên cứu các hoạt tính sinh học của dược liệu

(Manach *et al.*, 2005; Rasouli *et al.*, 2018).

Hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần của các mẫu cao chiết được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic và quercetin. Từ độ hấp thụ và nồng độ chất chuẩn ban đầu, tiến hành vẽ các đường tuyến tính về sự tương quan giữa hàm lượng chất chuẩn và độ hấp thụ trong dung dịch (Hình 1 và Hình 2).



Hình 1. Phương trình đường chuẩn acid gallic



Hình 2. Phương trình đường chuẩn quercetin

Từ phương trình đường chuẩn của acid gallic ($y = 0,0017x + 0,0197$) và quercetin ($y = 0,0004x + 0,0228$), thay giá trị độ hấp thụ trung bình của mẫu vào

y, xác định được hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần có trong các mẫu cao chiết. Kết quả được thể hiện qua Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol, flavonoid toàn phần

Mẫu	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/g cao)	Hàm lượng flavonoid (mg QE/g cao)
KH96	629,71 ± 21,34 ^{de}	90,19 ± 1,04 ^b
KH50	591,25 ± 12,80 ^{ef}	48,40 ± 1,78 ^{cd}
KHH ₂ O	569,13 ± 12,99 ^{fg}	27,01 ± 4,78 ^{ef}
CT96	927,96 ± 13,36 ^a	78,60 ± 2,15 ^b
CT50	803,96 ± 4,89 ^b	35,37 ± 2,10 ^{def}
CTH ₂ O	675,96 ± 12,47 ^{cd}	57,06 ± 4,00 ^c
CG96	715,79 ± 19,12 ^c	151,87 ± 10,75 ^a
CG50	607,95 ± 8,98 ^{ef}	20,71 ± 2,91 ^f
CGH ₂ O	536,10 ± 17,31 ^g	40,84 ± 2,70 ^{de}

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05 bằng phép thử Tukey.

KH96: Chanh không hạt chiết với ethanol 96%; KH50: Chanh không hạt chiết với ethanol 50%; KHH₂O: Chanh không hạt chiết với nước cất; CT96: Chanh tàu chiết với ethanol 96%; CT50: Chanh tàu chiết với ethanol 50%; CTH₂O: Chanh tàu chiết với nước cất; CG96: Chanh giấy chiết với ethanol 96%; CG50: Chanh giấy chiết với ethanol 50%; CGH₂O: Chanh giấy chiết với nước cất.

Hàm lượng polyphenol toàn phần của các mẫu cao chiết dao động từ 536,10 đến 927,96 (mg GAE/g cao). Các mẫu cao chiết trong cùng một loại lá chanh thì các mẫu cao chiết từ dung môi ethanol 96% cho hàm lượng polyphenol cao nhất, trong đó lá chanh tàu có hàm lượng polyphenol nổi trội hơn hai giống chanh còn lại, đặc biệt là mẫu CT96 (927,96 mg GAE/g cao). Bên cạnh đó, hàm lượng flavonoid thu được trong 3 loại lá chanh khoảng 20,71 đến 151,87 (mg QE/g cao). Tương tự polyphenol, hàm lượng flavonoid cao nhất có trong các mẫu chiết từ dung môi ethanol 96%, xét cùng một loại lá chanh. Tuy nhiên, flavonoid của các cao chiết từ chanh giấy và chanh không hạt thu được nhiều hơn khi so với chanh tàu, nổi bật là CG96 (151,87 mg

QE/g cao) và KH96 (90,19 mg QE/g cao).

Các nghiên cứu trên thế giới, phần lớn chỉ tập trung trên tinh dầu lá chanh, riêng có Al-Namani *et al.* (2018) đã xác định được hàm lượng hàm lượng polyphenol (96,55-322,57 µg GAE/mg cao) và hàm lượng flavonoid (41,38-64,2 µg QE/mg cao) lá chanh giấy trồng ở 2 vùng thuộc Oman (một quốc gia thuộc Trung Đông) bằng phương pháp chiết nóng với dung môi ethanol 95%.

3.4. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa

Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết được thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4. Khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao

Mẫu cao chiết	DPPH	FRAP
	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)
KH96	98,72 ± 0,57 ^d	2,23 ± 0,04 ^g
KH50	168,66 ± 0,24 ^h	1,10 ± 0,07 ^c
KHH ₂ O	174,98 ± 0,69 ⁱ	1,06 ± 0,05 ^c
CT96	69,76 ± 0,41 ^b	1,48 ± 0,02 ^d
CT50	80,66 ± 0,67 ^c	0,78 ± 0,06 ^b
CTH ₂ O	79,11 ± 0,21 ^c	0,68 ± 0,04 ^b
CG96	113,60 ± 0,27 ^c	2,37 ± 0,04 ^g
CG50	126,50 ± 0,33 ^f	1,95 ± 0,02 ^f
CGH ₂ O	157,73 ± 0,65 ^g	1,72 ± 0,05 ^e
Acid ascorbic	3,30 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,01 ^a

*Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05 bằng phép thử Tukey.

KH96: Chanh không hạt chiết với ethanol 96%; KH50: Chanh không hạt chiết với ethanol 50%; KHH₂O: Chanh không hạt chiết với nước cất; CT96: Chanh tàu chiết với ethanol 96%; CT50: Chanh tàu chiết với ethanol 50%; CTH₂O: Chanh tàu chiết với nước cất; CG96: Chanh giấy chiết với ethanol 96%; CG50: Chanh giấy chiết với ethanol 50%; CGH₂O: Chanh giấy chiết với nước cất.

Các mẫu cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa ở cả 2 phương pháp. Trong đó các mẫu cao chiết từ chanh tàu có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất và mẫu cao chiết từ chanh giấy là yếu nhất. Khả năng bắt gốc tự do DPPH và năng lực khử sắt của các mẫu cao chanh tàu mạnh nhất CT96, CT50, CTH₂O với giá trị IC₅₀ (DPPH) lần lượt là 69,76; 80,66; 79,11 µg/mL; giá trị EC₅₀ (FRAP) lần lượt là 1,48; 1,95; 0,68 µg/mL.

Trong đó, với phương pháp DPPH mẫu CT96 có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC₅₀ 69,76 µg/mL, thấp hơn chứng dương acid ascorbic khoảng 21,1 lần. Các mẫu cao chiết từ dung môi ethanol 96% có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh hơn dung ethanol 50% và nước cất. Kết quả có sự tương đồng với nghiên cứu của Sun *et al.* (2015) về ảnh hưởng của dung môi ethanol/nước đến đặc tính chống oxy hóa của keo ong Bắc Kinh. Theo nghiên cứu của Loizzo *et al.* (2012) mẫu cao chiết methanol từ lá chanh giấy với giá trị IC₅₀ (75,4 µg/mL) nên có hoạt tính kháng oxy hóa thấp hơn mẫu cao CT96 nhưng cao hơn các mẫu cao chiết từ chanh giấy của đề tài.

Kết quả khảo sát năng lực khử sắt cho thấy, mẫu CTH₂O có hoạt tính kháng oxy

hóa mạnh nhất với giá trị EC₅₀ 0,68 µg/mL, thấp hơn chứng dương acid ascorbic khoảng 3,2 lần. Mẫu cao KH96, CG96 có giá trị EC₅₀ (2,23; 2,37 µg/mL) khác biệt không ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 0,05 và đều có hoạt tính kháng oxy hóa yếu nhất, yếu hơn mẫu CTH₂O khoảng 3,4 lần. Theo nghiên cứu của Zeghad *et al.* (2019) về hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết từ trái nho (*Vitis vinifera*), trái lựu (*Punica granatum*), trái cam (*Citrus aurantium*), xương rồng Nopal (*Opuntia ficus-indica*) với dung môi methanol 70% có giá trị EC₅₀ lần lượt là 0,98; 2,61; 3,82; 8,04 mg/mL. Kết quả này cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu cao trên thấp hơn kết quả nghiên cứu của đề tài.

Sự tương quan giữa hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính kháng oxy hóa của từng loại lá chanh

Kết quả so sánh tương quan giữa hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính kháng oxy hóa với 2 phương pháp (DPPH, FRAP) của từng loại lá chanh trong nghiên cứu qua phân tích thống kê Pearson correlation được trình bày qua các Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7.

Bảng 5. Tương quan giữa polyphenol, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết từ lá chanh không hạt

	Polyphenol	Flavonoid	IC ₅₀ DPPH	EC ₅₀ FRAP
Polyphenol	1	0,796*	-0,807**	0,763*
Flavonoid		1	-0,960**	0,948**
IC ₅₀ DPPH			1	-0,994**
EC ₅₀ FRAP				1

Ghi chú: * Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,05; ** Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,01

Bảng 6. Tương quan giữa polyphenol, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết từ lá chanh tàu

	Polyphenol	Flavonoid	IC ₅₀ DPPH	EC ₅₀ FRAP
Polyphenol	1	0,480	-0,783*	0,905**
Flavonoid		1	-0,902**	0,789*
IC ₅₀ DPPH			1	-0,961**
EC ₅₀ FRAP				1

Ghi chú: * Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,05; ** Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,01

Bảng 7. Tương quan giữa polyphenol, flavonoid và khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết từ lá chanh giầy

	Polyphenol	Flavonoid	IC ₅₀ DPPH	EC ₅₀ FRAP
Polyphenol	1	0,835**	-0,921**	0,989**
Flavonoid		1	-0,615	0,872**
IC ₅₀ DPPH			1	-0,908**
EC ₅₀ FRAP				1

Ghi chú: ** Tương quan có ý nghĩa ở mức 0,01

Nhìn chung, kết quả từ Bảng 5 đến Bảng 7 cho thấy sự tương quan thuận giữa hai đại lượng polyphenol và flavonoid của các mẫu cao chiết từ lá của 3 giống chanh được khảo sát. Đặc biệt, ở những mẫu cao chiết từ lá chanh giầy có sự tương quan thuận với hệ số tương quan ($r = 0,835$) ở mức ý nghĩa 0,01 (Bảng 7); và các mẫu cao chiết từ lá chanh không hạt với hệ số tương quan ($r = 0,796$) ở mức ý nghĩa 0,05 (Bảng 5).

Kết quả còn cho thấy, hàm lượng polyphenol, flavonoid và giá trị IC₅₀ DPPH của các mẫu cao chiết có sự tương quan nghịch. Nghĩa là hàm lượng polyphenol, flavonoid càng cao thì giá trị IC₅₀ càng nhỏ nên khả năng bắt gốc tự do DPPH càng mạnh. Trong đó, hàm lượng polyphenol và IC₅₀ DPPH của cao chiết chanh không hạt, chanh tàu, chanh giầy đều có sự tương quan nghịch với hệ số

tương quan cao ở mức ý nghĩa 0,01; riêng cao chiết của chanh tàu có mức ý nghĩa ở 0,05. Ngược lại, hàm lượng flavonoid và IC₅₀ DPPH của cao chiết chanh không hạt và chanh tàu đều có sự tương quan nghịch với hệ số tương quan cao ở mức ý nghĩa 0,01.

Tóm lại, hàm lượng polyphenol và hàm lượng flavonoid có sự tương quan thuận với nhau. Bên cạnh đó, 2 giá trị hàm lượng polyphenol và flavonoid cũng thể hiện sự tương quan nghịch với IC₅₀ DPPH. Điều này có nghĩa là hàm lượng polyphenol và flavonoid trong các mẫu cao chiết ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng kháng oxy hóa của các mẫu cao chiết. Nghiên cứu của Kiselova *et al.* (2006), khảo sát sự tương quan giữa hoạt tính kháng oxy hóa và hàm lượng polyphenol của 23 loại dược liệu khác

nhau cũng đã cho thấy hệ số tương quan thuận giữa 2 đại lượng này ($r = 0,92$).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy lá chanh có chứa một lượng đáng kể polyphenol và flavonoid. Trong đó, các mẫu cao chiết từ ethanol 96% cho hàm lượng polyphenol, flavonoid cao nhất. Lá chanh tàu có hàm lượng polyphenol chiếm ưu thế và hàm lượng flavonoid cao hơn lá chanh không hạt và chanh giấy. Các mẫu cao đều thể hiện khả năng kháng oxy hóa qua cả hai phương pháp thử nghiệm, đặc biệt là các mẫu cao chiết ethanol 96% từ chanh tàu. Như vậy, từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, dung môi ethanol 96% là dung môi phù hợp hơn 2 dung môi còn lại để chiết xuất nhóm hợp chất polyphenol, flavonoid toàn phần cũng như khảo sát khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết từ lá chanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Namani, J., Baqir, E., Al Abri, A., Al Hubaishi, T., Husain, A. and Khan, S. A., 2018. Phytochemical screening, phenolic content and antioxidant activity of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in two regions of Oman. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 14. No. 1. p. 27-34.
2. Anggraini, T., 2015. Potency of *Citrus (Citrus aurantium)* water as inhibitor calcium lithogenesis on urinary tract. Jurnal Majority. Vol. 4. No. 1. p. 99-104
3. Balamurugan, S., 2014. *In vitro* antifungal activity of *Citrus aurantifolia* Linn plant extracts against

phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. International Letters of Natural Sciences. Vol. 8. No. 2. p. 70-74

4. Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N. and Skrypnik, L., 2019. Variation in phenolic compounds content and antioxidant activity of different plant organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at different growth stages. Antioxidants. Vol. 8. No. 7. p. 237-251.
5. Gokulakrishnan, K., Senthamilselvan, P. and Sivakumari, V., 2009. Regenerating activity of *Citrus aurantifolia* on paracetamol-induced hepatic damage. Asian Journal of Bio Science. Vol. 4. No. 2. p. 176-179.
6. Karimi, A. and Nasab, N. K., 2014. Effect of garlic extract and *Citrus aurantifolia* (lime) juice and on blood glucose level and activities of aminotransferase enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. World Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 2. No. 8. p. 821-827.
7. Khan Pathan, R., Gali, P. R., Pathan, P., Gowtham, T. and Pasupuleti, S., 2012. *In vitro* antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. Vol. 2. p. 328-331.
8. Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B. and Yankova, T., 2006. Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. Vol. 20. No. 11. p. 961-965.

9. Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C. and Menichini, F., 2012. Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 92. No. 15. p. 2960-2967.

10. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. The American journal of clinical nutrition. Vol. 81. No. 1. p. 230 – 242.

11. Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M., 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. Vol. 40(3). p. 255-260.

12. Maulana, T. I., Falah, S. and Andrianto, D., 2019. Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of water and ethanol extract from Surian (*Toona sinensis*) leaves. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Vol. 299. No. 1. p. 012-021. IOP Publishing.

13. Narang, N., and Jiraungkoorskul, W., 2016. Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. Pharmacognosy reviews. Vol. 10. No. 20. p. 118-122.

14. Ngo Thi To Quyen, Huynh Ngoc Thanh Tam, Mai Huynh Cang, Thien Hien

Tran, Nguyen Hong Khoi Nguyen, Hoang Le Tuan Anh, Thuy Trang Le Ngoc, Huynh Thi Kieu Linh and Nguyen Thi Ngoc Quyen, 2020. Essential oil from lemon (*Citrus aurantifolia*) grown in Ben Tre province, Vietnam: Condition extraction, chemical composition and antibacterial properties. Can Tho University Journal of Science. No. 32. p. 965-969.

15. Nguyễn Kim Phi Phụng 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Tr. 28-54.

16. Rasouli, H., Mohammad-Bagher Hosseini-Ghazvini, S. and Khodarahmi, R., 2018. Chapter 3: Therapeutic potentials of the most studied flavonoids: Highlighting antibacterial and antidiabetic functionalities. Studies in Natural Products Chemistry. Vol. 60. p. 85 - 118.

17. Reddy, L. J., Jalli, R. D., Jose, B. and Gopu, S., 2012. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the leaf essential oil and leaf extracts of *Citrus aurantiifolia*. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. Vol. 2. No. 2. p. 346-354.

18. Shalaby, N. M., Abd-Alla, H. I., Ahmed, H. H. and Basoudan, N., 2011. Protective effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* against osteoporosis and their phytochemical constituents. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 5. No. 4. p. 579-588.

19. Souza, A., Lamidi, M., Ibrahim, B., Aworet, S., Boukandou, M. and Batchi, B., 2011. Antihypertensive effect of an aqueous extract of *Citrus aurantifolia*

(Christm.) Swingle, on the arterial blood pressure of mammal. International Research of Pharmacy and Pharmacology. Vol. 1. p. 142-149.

20. Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H., 2011. Phytochemical screening and extraction: A Review. Internationale Pharmaceutica Scientia. Vol. 1. p. 98-106.

21. Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and

Yangsabai, A., 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicine. Vol 5. No. 3. p. 93-108.

22. Xi, W., Lu, J., Qun, J. and Jiao, B., 2017. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. Journal of Food Science and Technology. Vol. 54. No. 5. p. 1108-1118.

DETERMINATION CONTENT OF POLYPHENOL, FLAVONOID AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIME LEAF EXTRACTS (*CITRUS*)

Nguyen Chi Nguyen, Ngo Thu Thao,
Phung Nguyen Quoc Dinh and Huynh Ngoc Trung Dung*
Faculty of Pharmacy and Nursing, Tay Do University
(*Email: hntrungdung@gmail.com)

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the contents of total polyphenols, flavonoids, and the antioxidant activity of leaf extracts of three lime varieties: Citrus latifolia Tanaka, Citrus limonia Osbeck, and Citrus aurantifolia. Ethanol 96%, 50%, and distilled water were used as solvents. Four methods of Folin-Ciocalteu, AlCl₃ colorimetric, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power) were applied. Results showed that there was the presence of polyphenols, flavonoids, saponins, anthraquinones, and reducing compounds in the extracts. The highest polyphenol content was found in the 96% ethanol extract of Citrus limonia; the highest flavonoid content was found in the 96% ethanol extract of Citrus aurantifolia. The strongest antioxidant activity in the 96% ethanolic extract of Citrus limonia (in DPPH) was determined, in addition, the strongest antioxidant activity in the water extract of this lime variety (in FRAP) was recorded.

Keywords: Antioxidant activity, flavonoid, lime leaf, polyphenol