

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.)

Lý Hải Triều¹, Võ Tuấn Anh¹, Nguyễn Việt Hồng Phong¹,

Phạm Thị Mỹ Sa¹, Lâm Bích Thảo¹, Nguyễn Hoàng Lê², Lê Văn Minh^{1*}

(1) Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

(2) Khoa Y học cổ truyền, Bệnh viện Đại học Y Dược, thành phố Hồ Chí Minh cơ sở 03

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Các chất kháng oxy hóa tự nhiên có vai trò quan trọng trong phòng ngừa nhiều bệnh lý. Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát thành phần hoá thực vật, hoạt tính kháng oxy hoá và độc tính cấp đường uống của cao chiết từ vỏ quả Lựu (*Punica granatum* L.). **Đối tượng và phương pháp:** Thành phần hóa học của vỏ quả Lựu được xác định bằng phương pháp hóa học, sắc ký lớp mỏng, hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng. Hoạt tính kháng oxy hóa được đánh giá bằng thực nghiệm DPPH và MDA. Phương pháp Karber-Behlings được dùng khảo sát độc tính cấp đường uống để xác định LD₅₀. **Kết quả:** Vỏ quả Lựu chủ yếu chứa flavonoid, alkaloid, tannin, triterpen, saponin và coumarin. Cao chiết có hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng lần lượt là 189,97 mg đương lượng acid gallic/g trọng lượng khô và 9,42 mg đương lượng quercetin/g trọng lượng khô. Hoạt tính đánh bắt gốc tự do và ức chế peroxy hóa lipid của cao chiết (IC₅₀) lần lượt là 4,80 µg/ml và 0,38 µg/ml. Liều D_{max} (liều tối đa sử dụng trên chuột mà không có độc tính) của cao chiết là 21,28 g/kg, tương đương với 35,64 g dược liệu khô. **Kết luận:** Cao chiết vỏ quả Lựu không thể hiện độc tính cấp và có hoạt tính kháng oxy hóa cao.

Từ khóa: Vỏ quả Lựu; polyphenol; flavonoid; acid gallic; quercetin; kháng oxy hóa; độc tính cấp đường uống. **Viết tắt:** DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; MDA, malondialdehyd; IC₅₀, nồng độ ức chế 50%.

Abstract

PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ACUTE ORAL TOXICITY OF POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM* L.) FRUIT PEEL EXTRACT

Ly Hai Trieu¹, Vo Tuan Anh¹, Nguyen Viet Hong Phong¹,

Pham Thi My Sa¹, Lam Bích Thảo¹, Nguyen Hoang Len², Le Van Minh^{1*}

(1) Research Center of Ginseng and Medicinal Materials, National Institute of Medicinal Materials, Ho Chi Minh city

(2) Faculty of Traditional Medicine, Ho Chi Minh city Medicine&Pharmacy University Hospital

Background: The natural antioxidants have an important role in the prevention of many diseases. The aim of study is to investigate phytochemical components, antioxidant activity and acute oral toxicity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel (PFP) extract. **Materials and methods:** Phytochemicals of PFP were determined by qualitative chemical tests, thin layer chromatography, total polyphenol and flavonoid contents. The PFP extract was evaluated for antioxidant activity by DPPH assay and MDA assay. *In vivo* acute oral toxicity test was conducted using Karber-Behrens method to determine LD₅₀. **Results:** Results illustrated that PFP mainly contains flavonoids, alkaloids, tannins, triterpenes, saponins, and coumarins. PFP extract exhibited the total polyphenol and flavonoid contents with 189.97 mg gallic acid equivalent/g dry weight and 9.42 mg quercetin equivalent/g dry weight, respectively. The DPPH free radical scavenging and anti-lipid peroxidation activities of PFP extract were expressed with IC₅₀ value of 4.80 µg/mL and 0.38 µg/mL, sequentially. Simultaneously, the D_{max} (the maximum dose administered to mice that no toxicity was observed) of PFP extract was determined to be 21.28 g/kg, equivalent to 35.64 g dried herb. **Conclusion:** The PFP extract is relatively safe and revealed high antioxidant activity.

Keywords: *Punica granatum* L.; polyphenols; flavonoids; gallic acid; quercetin; antioxidant activity;

Địa chỉ liên hệ: Lê Văn Minh, email: lvminh05@gmail.com

Ngày nhận bài: 19/5/2019, Ngày đồng ý đăng: 20/6/2019; Ngày xuất bản: 1/7/2019

DOI: 10.34071/jmp.2019.4.1

acute oral toxicity. **Abbreviations:** PFP, Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peel; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; MDA, Malondialdehyde; IC_{50} , Half maximal inhibitory concentration.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Các gốc tự do oxy phản ứng (ROS) và các gốc tự do nitơ phản ứng (RNS) như superoxid, hydroxyl, hydro peroxid, nitric oxid và peroxyinitrit thường được sinh ra trong các quá trình chuyển hóa của tế bào hoặc dưới các tác động của các yếu tố bên ngoài. Thông thường, chúng sẽ được trung hòa bởi hệ thống chống oxy hóa nội sinh giúp giữ cân bằng cân oxy hóa và chống oxy hóa. Tuy nhiên, sự sản sinh quá mức của ROS và RNS làm phá vỡ cân oxy hóa và chống oxy hóa, dẫn đến tổn thương DNA, quá trình oxy hóa lipid và protein trong các tế bào, gây ra một số bệnh mãn tính và thoái hóa như đái tháo đường, ung thư, alzheimer, parkinson... [19]. Do đó, việc bổ sung các chất chống oxy hóa ngoại sinh góp phần giảm stress oxy hóa thông qua ức chế sự khởi đầu hoặc lan truyền của chuỗi phản ứng oxy hóa và hoạt động của các gốc tự do [5]. Một số chất chống oxy hóa ngoại sinh tổng hợp được sử dụng như hydroxytoluen, hydroxyanisol, butylhydroxyquinon; tuy nhiên, chúng ít nhiều ảnh hưởng đến chức năng gan, thận, tim mạch, hệ thần kinh và tạo ra chất gây ung thư [10]. Chính vì vậy, các chất chống oxy hóa tự nhiên có nguồn gốc từ thực phẩm và dược liệu như polyphenol (acid phenolic, flavonoid, anthocyanin, lignan và stilben), carotenoid (xanthophyll và caroten) và vitamin (vitamin E và C) được chú ý [5], [19].

Vỏ quả Lựu (*Punica granatum* L., Punicaceae), trong Đông y gọi là Thạch lựu bì, vị thuốc này chua, chát, tính ấm, độc ít, tác dụng thu liễm, chỉ tả, chỉ huyết, khu trùng, kháng virus, kháng u, bướng [1]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy vỏ quả Lựu có chứa polyphenol, flavonoid, alkaloid, anthraquinon, tannin, steroid, coumarin, triterpenoid, vitamin C và carbohydrat; trong đó, các hợp chất nhóm polyphenol được chứng minh góp phần chính vào các tác dụng sinh học của vỏ quả Lựu [14], [15], [16]. Một số hoạt chất có tác dụng phổ rộng được phân lập từ vỏ quả Lựu như flavonoid (pelargonidin, delphinidin, catechin, epicatechin, quercetin, rutin), tannin (ellagitannin, acid ellagic, punicalagin, punicalin, pedunculagin), acid phenolic (chlorogenic, caffeic, syringic, sinapic, *p*-coumaric, ferulic, ellagic, acid gallic và cinnamic) [16]. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học cho thấy vỏ quả Lựu có tác dụng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng ung thư, làm lành vết thương, kháng viêm, điều hòa đường huyết, bảo vệ gan, thận... [14], [15].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của vỏ quả Lựu còn rất hạn chế. Kết quả nghiên cứu của Đặng Kim Thu và cộng sự (2019) cho thấy phân đoạn dịch chiết ethyl acetat và butanol từ dịch chiết quả Lựu có tác dụng đánh bắt gốc tự do DPPH với IC_{50} lần lượt là 21,96 μ g/ml và 24,83 μ g/ml; ức chế enzyme protein tyrosin phosphatase 1B với IC_{50} lần lượt là 22,9 μ g/ml và 26,8 μ g/ml [4]. Tuy nhiên, chưa có công bố nào khác trong nước liên quan đến vỏ quả Lựu về các phân tích định tính và định lượng nhóm hoạt chất, hoạt tính kháng oxy hóa và tính an toàn của cao chiết. Vì vậy, việc thực hiện phân tích các chỉ tiêu trên và bước đầu đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa cũng như tính an toàn của cao chiết nhằm phục vụ công tác kiểm nghiệm chất lượng dược liệu và mở ra các nghiên cứu tiếp theo về hóa học và tác dụng dược lý của vỏ quả Lựu là rất cần thiết. Bài báo này lần đầu công bố các kết quả về sơ bộ thành phần hóa học thực vật, định tính, định lượng nhóm hợp chất chính, đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro*, *ex vivo* và độc tính cấp đường uống của cao chiết từ vỏ quả Lựu tại Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu vỏ Lựu được thu tại TP. HCM vào tháng 7 năm 2018. Mẫu được ThS. Lê Đức Thanh, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. HCM xác định tên khoa học là *Punica granatum* L.. Mẫu dược liệu được xay thành bột để nghiên cứu và lưu giữ tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh (Mã số lưu mẫu: TTS-VL-0718).

2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ

Ethanol 96% (Công ty Cổ phần Dược phẩm OPC), methanol (Merck), acid gallic và quercetin (đạt tiêu chuẩn phân tích, độ tinh khiết $\geq 98\%$), thuốc thử aluminum chloride ($AlCl_3$), Folin-Ciocalteu, acid ascorbic, acid thiobarbituric (Sigma-Aldrich*), Trolox (Calbiochem), tủ sấy Memmert (Đức), máy cô quay giảm áp Buchi, bản silica gel F_{254} trắng sẵn trên nền nhôm (Merck), bình chiết ngấm kiệt và một số dụng cụ, hóa chất khác.

2.3. Động vật thử nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* (*Mus musculus* var. *albino*) đực và cái, 5–6 tuần tuổi, được cung cấp bởi Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang. Chuột sử dụng khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi bằng thực phẩm dạng viên (Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang),

nước uống đầy đủ và được để ổn định ít nhất một tuần trước khi thử nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Sơ bộ thành phần hóa thực vật

Dịch chiết từ bột khô vỏ quả Lựu được kiểm tra sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, saponin, coumarin, anthraquinon, anthocyanosid, proanthocyanidin, chất béo, tinh dầu, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử theo phương pháp của Cuiley có sửa đổi (Trường Đại học Rumani) [8].

Phương pháp chiết cao vỏ Lựu

Bột nguyên liệu (1000 g, độ ẩm 9,94%) được chiết ngấm kiệt (tỷ lệ 1: 15) với ethanol 45% ở nhiệt độ phòng với thời gian ngâm chiết là 24 giờ. Dịch chiết được rút với tốc độ 2 ml/phút và cô quay chân không dưới áp suất giảm ở 60 °C thu được cao chiết tổng. Hiệu suất thu cao chiết đạt 59,71%.

Phương pháp thử độ tinh khiết, định tính polyphenol và flavonoid

Thử tinh khiết được liệu và cao chiết theo Dược điển Việt Nam V về mất khối lượng do làm khô (độ ẩm), độ tro toàn phần và độ tro không tan trong acid.

Định tính bằng phương pháp hóa học với các thuốc thử đặc trưng của polyphenol và flavonoid.

Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng theo chuẩn acid gallic (polyphenol) và quercetin (flavonoid).

Phương pháp định lượng polyphenol và flavonoid tổng

Hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết tổng được xác định bằng phương pháp UV-Vis theo chuẩn acid gallic theo mô tả trước đây bởi Chumark và cộng sự (2008) [7]. Hàm lượng phenolic tổng được tính bằng mg đương lượng acid gallic có trong 1 g mẫu thử (mg GAE/g trọng lượng khô).

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp UV-Vis theo chuẩn quercetin. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch chiết (từ phân đoạn ethyl acetat), 8 ml methanol và 1 ml $AlCl_3$ 2%, lắc đều. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 454 nm. Hàm lượng flavonoid toàn phần được tính bằng mg đương lượng quercetin có trong 1 g mẫu thử (mg QE/g trọng lượng khô) [13].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa

Thử nghiệm đánh bắt gốc tự do DPPH in vitro

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là một gốc tự do có bước sóng hấp thụ cực đại tại 515 - 517 nm và có màu tím. Các chất có khả năng chống oxy hóa sẽ trung hòa DPPH bằng cách cho hydrogen, làm màu của dung dịch phản ứng sẽ nhạt dần, chuyển từ tím sang vàng. Sự giảm màu được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 515 - 517 nm. Quy trình được thực hiện theo mô tả bởi Chumark và cộng sự

(2013) [7] có sửa đổi như sau: Hỗn hợp phản ứng trong methanol bao gồm 0,5 ml cao chiết tổng 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 30 phút ở nhiệt độ phòng trong tối. Tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 516 nm. Sử dụng mẫu trắng là methanol. Acid ascorbic (vitamin C, Sigma-Aldrich®) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Thực hiện 3 lần trên mỗi mẫu, lấy giá trị trung bình từng mẫu và tính toán.

Thử nghiệm ức chế peroxy hóa lipid ex vivo (thử nghiệm MDA)

Đánh giá khả năng làm giảm hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, để xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid của mẫu khảo sát. MDA có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric (TBA) để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có độ hấp thụ cực đại ở 532 nm.

Quy trình được thực hiện theo mô tả bởi Huong và cộng sự (1998) [12] có sửa đổi như sau: 0,5 ml dung dịch đồng thể não chuột trong dung dịch đệm phosphat 5 mM (não: dung dịch đệm = 1: 10) trộn với 0,1 ml cao chiết tổng ở các nồng độ khác nhau và 1,4 ml dung dịch đệm. Hỗn hợp được ủ ở 37 °C trong 15 phút. Sau đó, kết thúc phản ứng bằng 1 ml acid trichloacetic 10%, ly tâm 10000 vòng/phút. Lấy 2 ml dịch trong sau ly tâm phản ứng với 1 ml TBA 0,8% ở 100 °C trong 15 phút. Tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 532 nm. Sử dụng mẫu trắng là dung dịch đệm. Trolox (đồng phân của vitamin E, Calbiochem Ltd. Co.) được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Thực hiện 3 lần trên mỗi mẫu, lấy giá trị trung bình và tính toán.

Đánh giá kết quả kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa (HTKO%) được tính theo công thức: $HTKO\% = [(OD_c - OD_t)/OD_c] \times 100$. Trong đó, OD_c và OD_t lần lượt là độ hấp thụ quang của mẫu chứng (không có cao chiết) và mẫu thử (có cao chiết). Hoạt tính kháng oxy hóa cũng được đánh giá thông qua giá trị IC_{50} (Inhibitory concentration) là nồng độ chất chống oxy hóa cần ức chế (trung hòa) 50% gốc tự do DPPH hay ức chế peroxy hóa lipid. Giá trị IC_{50} được tính dựa theo phương trình thể hiện sự tương quan giữa nồng độ chất thử và tỷ lệ % hoạt tính kháng oxy hóa.

Phương pháp khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng

Nghiên cứu độc tính cấp của thuốc trên động vật thử nghiệm chủ yếu là xác định liều chết trung bình (LD_{50}), tức là liều làm chết 50% số con vật thử nghiệm trong những điều kiện nhất định.

Khảo sát trải qua hai giai đoạn: Thử nghiệm sơ khởi (3 chuột đực, 3 chuột cái, trọng lượng 20 ± 2 g) và thử nghiệm xác định (6 chuột đực, 6 chuột cái, trọng lượng 20 ± 2 g). Chuột được cho nhịn đói ít nhất 12 giờ, được cho uống cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu liều duy nhất tối đa có thể qua kim (thể tích 20 ml/kg) theo hướng dẫn của Bộ Y tế và tài liệu chuyên môn [2], [3]. Theo dõi những biểu hiện tổng quát của chuột như vận động, ăn uống, trạng thái lông, hành vi, tiêu tiểu và số lượng chuột chết trong 72 giờ. Sau 72 giờ, nếu chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết thì tiếp tục theo dõi trong

7 ngày và 14 ngày. Nếu số chuột vẫn bảo toàn, xác định được liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chết chuột (D_{max}). Nếu có chuột chết, giảm liều, xác định liều tối thiểu gây chết 100% chuột (LD_{100}), liều tối đa không gây chết chuột nào (LD_0) và liều gây chết 50% chuột (LD_{50}).

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: $M \pm SEM$ (M: giá trị trung bình, SEM—Standard Error of the Mean: sai số chuẩn của giá trị trung bình). Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016, xử lý thống kê dựa vào phép kiểm t-test.

3. KẾT QUẢ

3.1. Thành phần hóa học vỏ quả Lựu

Kết quả phân tích thành phần hóa học cho thấy trong vỏ quả Lựu có sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, saponin, coumarin, anthraquinon, proanthocyanidin, anthocyanosid, acid hữu cơ và chất khử (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần hóa học của vỏ quả Lựu

Nhóm hợp chất	Mức độ phản ứng	Nhóm hợp chất	Mức độ phản ứng
Alkaloid	+++	Proanthocyanidin	+
Flavonoid	++++	Anthocyanosid	+
Tannin	+++	Chất béo	-
Triterpenoid	++	Tinh dầu	-
Saponin	++	Carotenoid	-
Coumarin	+	Các acid hữu cơ	+
Anthraquinon	++	Chất khử	+

Chú thích: (-): không có, (+): có ít, (++) có, (+++) có nhiều, (++++): có rất nhiều.

3.2. Thử độ tinh khiết

Nguyên liệu và cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu được kiểm tra độ tinh khiết dựa theo Dược điển Việt Nam V thu được các kết quả sau: Độ ẩm trung bình của dược liệu là $9,94\% \pm 0,05$ và cao chiết là $14,33\% \pm 0,45$ đều đạt tiêu chuẩn tham chiếu theo Dược điển Việt Nam V (độ ẩm dược liệu < 13%, độ ẩm cao đặc < 20%). Tương tự, độ tro toàn phần trung bình của dược liệu, cao chiết và độ tro không tan trong acid trung bình của dược liệu lần lượt là $4,63\% \pm 0,03$, $4,29\% \pm 0,04$ và $0,43\% \pm 0,02$, trong giới hạn cho phép.

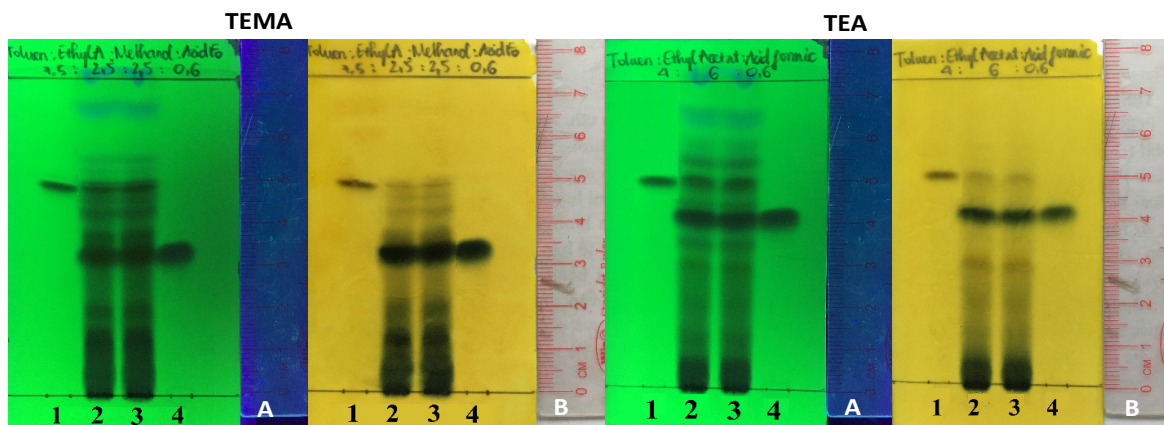
3.3. Định tính polyphenol và flavonoid bằng phương pháp hóa học

Dịch chiết từ nguyên liệu và cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu đều cho phản ứng dương tính rõ rệt với thuốc thử đặc trưng của polyphenol và flavonoid (Bảng 2).

Bảng 2. Phản ứng hóa học định tính polyphenol và flavonoid trong nguyên liệu và cao chiết

Mẫu	Nguyên liệu	Cao chiết
Ống 1: Ethanol 45% (dung môi chiết)	Trong suốt	Trong suốt
Ống 2: Dịch chiết (đối chứng)	Vàng trong	Vàng trong
Ống 3: Dịch chiết + TT NaOH 10%	Vàng đậm (tăng màu)	Vàng đậm (tăng màu)
Ống 4: Dịch chiết + TT FeCl ₃ 5%	Xanh đen	Xanh đen
Ống 5: Dịch chiết + TT Cyanidin	Đỏ hồng	Đỏ hồng
Ống 6: Dịch chiết + TT Pb(CH ₃ COO) ₂ 10%	Tủa trắng	Tủa trắng

3.4. Định tính polyphenol và flavonoid bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng



Hình 1. Sắc ký đồ định tính đồng thời polyphenol và flavonoid trong dịch chiết vỏ quả Lựu.

(1) Chuẩn quercetin, (2) Nguyên liệu, (3) Cao chiết, (4) Chuẩn acid gallic. Quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 254 nm (A), quan sát dưới ánh sáng thường có phun thuốc thử FeCl_3 5% trong ethanol (B).

TEMA: Toluene: Ethyl acetate: Methanol: Acid formic; **TEA:** Toluene: Ethyl acetate: Acid formic.

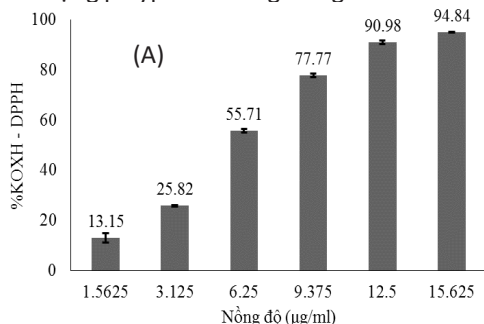
Dịch chiết vỏ quả Lựu được khảo sát với hai hệ dung môi khai triển phân tích đồng thời polyphenol và flavonoid bao gồm Toluene: Ethyl acetate: Methanol: Acid formic (**TEMA**, 75: 25: 25: 6 v/v) và Toluene: Ethyl acetate: Acid formic (**TEA**, 40: 60: 6 v/v). Giá trị R_f của mẫu ở hai hệ dung môi TEMA và TEA lần lượt là 0,42 và 0,57 (tương ứng với chuẩn acid gallic), 0,63 và 0,64 (tương ứng với chuẩn quercetin).

Hình 1 cho thấy màu sắc và giá trị R_f của các vết thu được trên sắc ký đồ của mẫu chiết từ cao chiết, tương ứng với màu sắc và giá trị R_f mẫu nguyên liệu và trùng với vết của mẫu chuẩn acid gallic và quercetin.

Điều này chứng tỏ có sự hiện diện đồng thời của hai hoạt chất acid gallic và quercetin trong nguyên liệu và cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu.

3.5. Định lượng polyphenol tổng theo chuẩn acid gallic và flavonoid tổng theo chuẩn quercetin trong nguyên liệu và cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu bằng phương pháp UV-Vis

Hàm lượng polyphenol tổng trung bình tính theo

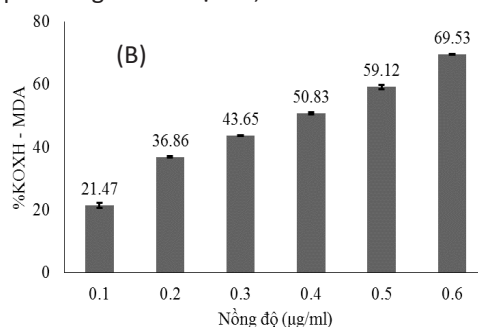


phương trình hồi quy chuẩn acid gallic ($Y = 0,0097x - 0,0278$, $R^2 = 0,997$) trong mẫu cao chiết là $189,97 \pm 1,28$ mg GAE/g trọng lượng khô, cao hơn đạt ý nghĩa thống kê so với mẫu nguyên liệu ($78,87 \pm 0,46$ mg GAE/g trọng lượng khô).

Tương tự, hàm lượng flavonoid toàn phần trung bình tính theo phương trình hồi quy chuẩn quercetin ($Y = 0,0219x - 0,0554$, $R^2 = 0,998$) trong mẫu cao chiết là $9,42 \pm 0,16$ mg QE/g trọng lượng khô, cao hơn đạt ý nghĩa thống kê so với mẫu nguyên liệu ($2,92 \pm 0,05$ mg QE/g trọng lượng khô).

3.6. Hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu được đánh giá thông qua thử nghiệm đánh bắt gốc tự do DPPH và ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA) (**Hình 2**). Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết thể hiện hoạt tính đánh bắt gốc tự do DPPH trên 50% (55,71%) ở nồng độ 6,25 µg/ml. Trong khi đó, ở nồng độ thấp hơn 0,4 µg/ml, cao chiết có phần trăm ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào đạt 50,83%.



Hình 2. Tỷ lệ đánh bắt gốc tự do DPPH (A) và ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào (B) của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu

Bên cạnh đó, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu còn được thể hiện thông qua giá trị IC_{50} (Hình 3). Giá trị IC_{50} của cao chiết ở các thử nghiệm được xác định dựa trên phương trình thể hiện sự tương quan giữa nồng độ chất thử và tỷ lệ % hoạt tính kháng oxy hóa (Bảng 3). Giá trị IC_{50} của cao chiết trong thử nghiệm DPPH đạt 4,80 $\mu\text{g/ml}$ gần bằng với giá trị IC_{50} của chứng dương acid ascorbic (4,37 $\mu\text{g/ml}$).

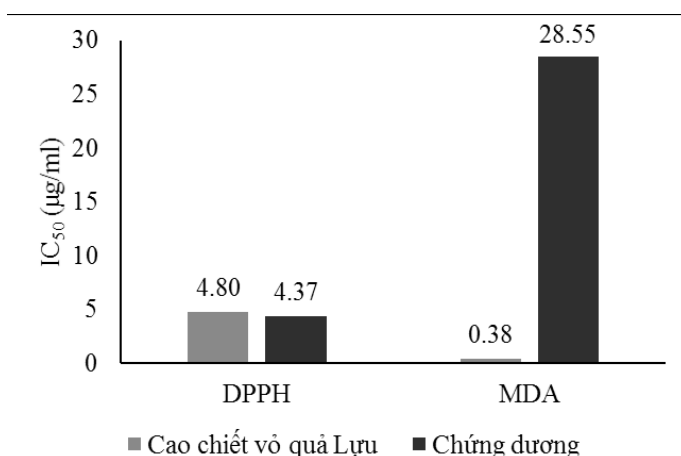
Đặc biệt, trong thử nghiệm MDA, giá trị IC_{50} của

cao chiết thấp hơn nhiều so với chứng dương trolox (0,38 $\mu\text{g/ml}$ so với 28,55 $\mu\text{g/ml}$).

Kết quả nghiên cứu chứng minh cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa theo cơ chế đánh bắt gốc tự do DPPH tương đương acid ascorbic và ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào tốt hơn trolox. Do đó, vỏ quả Lựu có thể là dược liệu tiềm năng trong điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh lý có liên quan đến hệ thống chống oxy hóa của cơ thể.

Bảng 3. Phương trình tương quan giữa nồng độ mẫu thử và % hoạt tính kháng oxy hóa

Mẫu thử	DPPH		MDA	
	Phương trình	R^2	Phương trình	R^2
Cao chiết	$y = 38,399\ln(x) - 10,247$	0,9761	$y = 89,796x + 15,48$	0,9832
Acid ascorbic	$y = 31,266\ln(x) + 3,8958$	0,9789	-	-
Trolox	-	-	$y = 16,253\ln(x) - 4,4754$	0,9737



Hình 3. Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu và chứng dương acid ascorbic (DPPH) và trolox (MDA) trong hai thử nghiệm

3.7. Khảo sát độc tính cấp đường uống

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp đường uống của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu

Thử nghiệm	Liều dùng (g/kg thể trọng chuột)	Số chuột đực (con)	Số chuột cái (con)	Số chuột chết trong lô (con)	Phân suất tử vong (%)
Sơ khởi	21,28	3	3	0	0
Xác định	21,28	6	6	0	0

Trong suốt thời gian 72 giờ đầu tiên và 2 tuần quan sát, không ghi nhận bất kỳ dấu hiệu bất thường nào xảy ra trên chuột thử nghiệm. Tất cả chuột đều hoạt động, ăn uống bình thường, không có chuột tử vong. Sau 2 tuần theo dõi, chuột ở tất cả các lô được giải phẫu cho thấy không có bất kỳ thay đổi bệnh lý nào về hình thái đại thể của các cơ quan như tim, phổi, gan, thận, bàng quang và hệ thống tiêu hóa. Do đó, không tìm được LD_{50} và xác định được liều tối đa có thể bơm qua kim mà không gây

chết chuột D_{max} là 21,28 g/kg thể trọng chuột, tương đương 35,64 g dược liệu khô. Như vậy, cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu không thể hiện độc tính cấp đường uống với liều tối đa có thể bơm qua kim. Điều này cho thấy, cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu có độ an toàn trên động vật thử nghiệm.

4. BÀN LUẬN

Chất chống oxy hóa có vai trò rất quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể tránh những tác động gây hại của

stress oxy hóa gây ra bởi gốc tự do. Nghiên cứu này chứng minh cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu có hoạt tính kháng oxy hóa cao thông qua thử nghiệm đánh bắt gốc tự do DPPH và ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào. Điều thú vị là nghiên cứu đã phát hiện cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa tương đương thuốc đối chiếu trong thử nghiệm DPPH với giá trị IC_{50} đạt 4,80 $\mu\text{g/ml}$ so với acid ascorbic (vitamin C) là 4,37 $\mu\text{g/ml}$, tốt hơn so với dịch chiết ethyl acetat và butanol từ dịch chiết quả Lựu (IC_{50} lần lượt là 21,96 $\mu\text{g/ml}$ và 24,83 $\mu\text{g/ml}$) [4].

Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa theo cơ chế bắt gốc tự do DPPH của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu cao hơn so với một số công bố trước đây [6], [9], [20]. Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid màng tế bào của cao chiết tốt hơn rất nhiều so với thuốc đối chiếu với giá trị IC_{50} đạt 0,38 $\mu\text{g/ml}$ so với trolox là 28,55 $\mu\text{g/ml}$ và cao hơn so với một số công bố trước đây [6], [17]. Mặc dù, cao chiết còn ở dạng hỗn hợp, chưa được tinh sạch nhưng hiệu quả tương đương hoặc tốt hơn những đơn chất đã được tinh sạch và thương mại. Điều này có thể do thành phần hóa học riêng lẻ trong dược liệu hợp thành.

Kết quả phân tích thành phần hóa thực vật cho thấy vỏ quả Lựu có sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, saponin, coumarin, anthraquinon, proantocyanidin, anthocyanosid, acid hữu cơ và chất khử; kết quả này tương đồng với một số công bố trước đây [14], [15], [16]. Công bố trước đây chứng minh acid gallic và quercetin là hai hợp chất được phân lập từ vỏ quả Lựu [16]. Đồng thời, kết quả phân tích định tính bằng sắc ký lớp mỏng cũng cho thấy sự có mặt của hai hợp chất này trong nguyên liệu và cao chiết từ vỏ quả Lựu. Vì vậy, acid gallic và quercetin được sử dụng làm chất chuẩn để tiến hành định lượng polyphenol và flavonoid tổng trong vỏ quả Lựu. Kết quả cho thấy, hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng trong cao chiết vỏ quả Lựu tương ứng là 189,97 mg GAE/g và 9,42 mg QE/g.

Nghiên cứu trước đây cho thấy các hợp chất polyphenol như flavonoid, tannin và acid phenolic đóng vai trò chính cho các tác dụng sinh học của vỏ quả Lựu [16]. Polyphenol nói chung có tác dụng chống oxy hóa bởi đặc tính cho hydrogen từ các

nhóm hydroxyl của chúng; flavonoid và tannin cũng thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, khử gốc tự do [11]. Mặt khác, acid gallic và quercetin là những hợp chất có trong vỏ quả Lựu được chứng minh có đặc tính kháng oxy hóa tốt và được sử dụng như chất đối chiếu trong một số nghiên cứu. Nghiên cứu cấu trúc hóa học cho thấy các nhóm hydroxyl ở vòng B và C đóng góp chủ yếu vào hoạt động chống oxy hóa của quercetin [18], [21].

Hơn nữa, mặc dù phần lớn dược liệu không hoặc ít tác dụng phụ nhưng việc kiểm chứng khoa học về độc tính và tác dụng phụ là rất cần thiết. Đây là bước đầu tiên được quy định thực hiện trong các nghiên cứu tiền lâm sàng hay lâm sàng các thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Kiểm tra này không chỉ giúp xác định phạm vi và nồng độ của liều có thể được sử dụng mà còn cho phép quan sát các dấu hiệu lâm sàng có thể xảy ra sau dùng thuốc. Ngoài ra, đây cũng là một thông số hữu ích để xác định chỉ số điều trị của cao thuốc. Trong nghiên cứu này tính an toàn của cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu bước đầu được đánh giá thông qua thực nghiệm khảo sát độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng. Kết quả cho thấy cao chiết vỏ quả Lựu không gây biểu hiện độc tính cấp đường uống ở liều tối đa có thể bơm qua kim với D_{max} là 21,28 g cao/kg thể trọng chuột.

Các kết quả nghiên cứu đề nghị rằng chiết xuất từ vỏ quả Lựu là một ứng cử viên tiềm năng để nghiên cứu tác dụng dược lý và phát triển thành các chế phẩm có vai trò trong việc điều trị hay hỗ trợ điều trị bệnh và bảo vệ sức khỏe của con người.

5. KẾT LUẬN

Vỏ quả Lựu có sự hiện diện của nhiều nhóm hợp chất, trong đó polyphenol và flavonoid được xác định là nhóm hợp chất chính trong dược liệu này. Vỏ quả Lựu có sự hiện diện của acid gallic và quercetin. Hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng trung bình trong cao chiết ethanol 45% từ vỏ quả Lựu lần lượt là $189,97 \pm 1,28$ mg GAE/g và $9,42 \pm 0,16$ mg QE/g. Cao chiết vỏ quả Lựu có hoạt tính kháng oxy hóa cao thông qua thử nghiệm DPPH và MDA với giá trị IC_{50} lần lượt là 4,80 $\mu\text{g/ml}$ và 0,38 $\mu\text{g/ml}$. Đồng thời, cao chiết không gây biểu hiện độc tính cấp đường uống ở liều tối đa có thể cho uống D_{max} là 21,28 g cao/kg thể trọng chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, Trần Hợp (2001). Cây cỏ có ích ở Việt Nam, Nhà xuất bản Giáo dục, 255.

2. Đỗ Trung Đàm (1996). Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc. NXB Y học, Hà Nội, 6-24, 50-57.

3. Bộ Y tế (2015). Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Ban hành theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
4. Đặng Kim Thu, Nguyễn Lê 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.), *Tạp chí Dược học*, Số: 516 - Tháng 4/2019, 54-56, 67.
5. Baiano, A., del Nobile, M.A. (2015). Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 56, 2053-2068.
6. Barathikannan, K., Venkatadri, B., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., Agastian, P., Arasu, M. V., Choi, H. S., Kim, Y. O. (2016). Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its *in vitro* and *in vivo* biological properties. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 264.
7. Chumark, P., Panya, K., Yupin, S., Srichan, P., Noppawan, M. (2008). The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antitherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leave". *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 439-436.
8. Ciulei, I., (1982). Methodology for analysis of vegetables drugs. Ministry of Chemical Industry; Bucarest, Roumania, 67.
9. El-Hadary, A.E., Ramadan, M.F. (2019). Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *Food Biochemistry*, 43(4):e12803.
10. Fernandes, R.P., Trindade, M.A., Tonin, F.G., Lima, C.G., Pugine, S.M., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., de Melo, M.P. (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.
11. Formagio, A.S., Volobuff, C.R., Santiago, M., Cardoso, C.A., Vieira, M., Valdevina Pereira, Z. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 3(4), 745-757.
12. Huang, N. T. T., Matsumoto, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Watanabe, H. (1998). *In vitro* Antioxidant activity of Vietnamese Ginseng saponin and its components. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 21(9), 978-981.
13. Nguyen, T.T., Parat, M.O., Hodson, M.P., Pan, J., Shaw, P.N., Hewavitharana, A.K. (2015). Chemical characterization and *in vitro* cytotoxicity on squamous cell carcinoma cells of *Carica papaya* leaf extracts. *Toxins* (Basel), 8(1), 7.
14. 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.
15. Saeed, M., Naveed, M., BiBi, J., Kamboh, A.A., Arain, M.A., Shah, Q.A., Alagawany, M., El-Hack, M.E.A., Abdel-Latif, M.A., Yatoo, M.I., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2018). The promising pharmacological effects and therapeutic/medicinal applications of *Punica granatum* L. (Pomegranate) as a functional food in humans and animals. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 12(1), 24-38.
16. Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem*, 261, 75-86.
17. Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the Antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 81-86.
18. Velderrain-Rodríguez, G.R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Robles-Zepeda, R.E., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G.A. (2018). Gallic acid Content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of 'Ataulfo' Mango peel on LS180 cells. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(3), 695.
19. Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.J., Li, H.B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.
20. Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhir, A., Heyden, Y. V., Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5(4), e01575.
21. Zheng, Y.Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D.F., Guo, R., Lai, R.C. (2017). Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. *Scientific reports*, 7(1), 7543.