

NGHIÊN CỨU TẠO DỊCH CHIẾT MANG HOẠT TÍNH CHỐNG OXI HÓA TỪ VỎ QUẢ LỰU

● NGUYỄN THỊ XUYỀN - PHẠM HÀ VINH KHÁNH - LÊ TRIỆU HUY - BÙI THỊ THU TRANG
- NGUYỄN TUẤN ANH - TRẦN VĂN DŨNG - PHẠM THỊ LAN*

TÓM TẮT:

Thời gian gần đây, các hợp chất chống oxy hóa có nguồn gốc thiên nhiên ngày càng được quan tâm bởi tác dụng phòng bệnh và mức độ an toàn với con người. Trong nghiên cứu này, dịch chiết từ vỏ quả lựu đã được chiết xuất và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, vỏ quả lựu được chiết xuất sử dụng ethanol 96% trong 24 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng cho hàm lượng tổng polyphenol sau làm giàu là $122,2 \pm 0,23$ mg GAE/g. Giá trị IC_{50} khi thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do với DPPH đạt được là $3,58 \mu\text{g/mL}$, tương đương với mẫu đối chứng dương vitamin C với giá trị IC_{50} là $3,12 \mu\text{g/mL}$.

Từ khóa: hoạt tính chống oxy hóa, dịch chiết, vỏ quả lựu.

1. Tổng quan

Lựu (*Punica granatum* L.) là loại trái cây rất phổ biến trên thế giới, được biết đến với nhiều lợi ích cho sức khỏe, như khả năng chống oxy hóa, chống viêm cũng như ngăn ngừa bệnh tiểu đường, béo phì... [1]. Việc tiêu thụ lựu tạo ra một lượng lớn chất thải nông nghiệp, chủ yếu là vỏ quả, có thể nặng tới 50% khối lượng của quả tươi [2-3]. Theo ước tính, vỏ quả lựu có thể chiếm tới 1,6 tỷ tấn chất thải thực phẩm hàng năm của thế giới [4]. Vỏ quả lựu, mặc dù được coi là phụ phẩm nông nghiệp, nhưng lại được phát hiện là nguồn cung cấp polyphenol dồi dào, đặc biệt là axit ellagic, hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa cao [4]. Theo các báo cáo, tổng lượng phenolic nằm trong khoảng từ 18 đến 510 mg/g chất khô trong vỏ quả lựu, khác nhau tùy theo giống quả, dung môi chiết và phương pháp chiết [4]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy, vỏ quả lựu có chứa nhiều 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 [5].

Tại Việt Nam, một số bộ phận của cây lựu cũng được nghiên cứu [6-9]. Mặc dù, vỏ quả lựu được chứng minh có nhiều giá trị sử dụng, nhưng trên thực tế, đây vẫn là bộ phận bị thải bỏ sau khi thu dịch ép hoặc hạt. Để cung cấp thêm thông tin về tác dụng sinh học của vỏ quả lựu tại Việt Nam, góp phần tăng giá trị sử dụng của nguyên liệu/phụ phẩm này, trong nghiên cứu này dịch chiết từ vỏ quả lựu sẽ được chiết xuất và xác định hoạt tính chống oxy hóa.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Nguyên liệu:

Vỏ quả lựu được thu mua tại các chợ dân sinh khu vực Hà Nội, sau đó được sấy khô đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ và lưu giữ trong bình hút ẩm.

Hóa chất:

Dung môi ethanol 96%, dung dịch axit sunfuric 98% được sản xuất bởi hãng Xilong, Trung Quốc. Thuốc thử Folin-Ciocalteu, chất chuẩn axit gallic và chất đối chứng axit ascorbic được mua từ hãng Merk, Mỹ. Hóa chất 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có nguồn gốc từ Nhật Bản.

2.2. Quy trình chiết xuất

Quy trình chiết xuất vỏ quả lựu được thực hiện theo quy trình chiết xuất các hợp chất thiên nhiên nói chung, bao gồm các bước chiết xuất cạn tổng và chiết phần đoạn trong dung môi ethylacetate để làm giàu cạn chiết.

Trong nghiên cứu này, vỏ quả lựu khô được chiết xuất với ethanol có nồng độ khác nhau, việc đánh giá và lựa chọn phương pháp phù hợp dựa trên hiệu suất chiết xuất và hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết thu được.

Phương pháp 1: Ngâm vỏ lựu khô đã nghiền nhỏ trong dung môi ethanol 40%, ở 50°C, trong 2 giờ. Sau đó, bã vỏ quả lựu tiếp tục được axit hoá bằng axit sunfuric với nồng độ 20%, cuối cùng được lọc rửa ba lần thu lấy dịch chiết.

Phương pháp 2: Ngâm vỏ lựu đã nghiền nhỏ trong dung môi ethanol 96%, trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó lọc rửa ba lần để thu lấy dịch chiết.

Dịch chiết thu được ở cả hai phương pháp trên được cô quay ở điều kiện áp suất 60 mbar, nhiệt độ 40°C để loại bỏ dung môi, thu được cạn chiết ethanol. Các cạn chiết này được sấy trong tủ sấy chân không ở 50°C đến khối lượng không đổi, kí hiệu lần lượt là DC1 và DC2 tương ứng với hai phương pháp chiết xuất 1 và 2.

Hiệu suất chiết xuất được tính toán theo công thức dưới đây:

$$H = \frac{m_{\text{cao chiết}}}{m_{\text{vỏ lựu khô}}} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó, $m_{\text{cao chiết}}$ (g) là khối lượng của cao chiết thu được; $m_{\text{vỏ lựu khô}}$ (g) là khối lượng của mẫu vỏ quả lựu khô thực hiện thí nghiệm; H (%) là hiệu suất của quá trình chiết xuất.

2.3. Làm giàu dịch chiết

Quá trình làm giàu dịch chiết được thực hiện sau khi đã lựa chọn được phương pháp chiết xuất phù hợp. Dịch chiết được phân tán với 1L nước cất và

thực hiện quá trình chiết phân bố lỏng - lỏng với dung môi ethylacetate. Quá trình được lặp lại 3 lần. Cuối cùng cao chiết thu được bằng cách loại bỏ dung môi hữu cơ với máy cất quay chân không dưới áp suất 100 mbar, 40°C.

2.4. Xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPC)

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu với chất chuẩn axit gallic [10]. Các polyphenol trong dịch chiết vỏ lựu tạo phức màu xanh với thuốc thử Folin-Ciocalteu và hấp thụ ở bước sóng 765 nm (Hình 1).

Hình 1: Hình ảnh các ống nghiệm chứa phức màu xanh của dịch chiết vỏ lựu với axit gallic



Nguồn: Kết quả nghiên cứu của tác giả

Từ phương trình đường chuẩn của axit gallic và giá trị mật độ quang của mẫu thử ở cùng điều kiện, xác định được nồng độ polyphenol tổng trong dung dịch mẫu thử và tính được hàm lượng polyphenol tương đương axit gallic (GAE) có trong mẫu thử.

Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu được tính theo công thức:

$$TP \text{ (mg GAE/g)} = \frac{C_{\text{đc}} \times V \times K \times H}{m} \quad (2)$$

Trong đó:

TP: hàm lượng polyphenol tương đương axit gallic (mg GAE/g mẫu);

$C_{\text{đc}}$: nồng độ tương đương axit gallic được suy ra từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$);

K: hệ số pha loãng;

H: độ sạch chuẩn axit gallic (97%)

V: thể tích mẫu định mức (10 mL);

m: Khối lượng mẫu thử nghiệm (mg).

2.5. Xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết

Thí nghiệm khảo sát khả năng chống oxy hóa của dịch chiết được thử nghiệm bởi khả năng bắt gốc tự do với DPPH.

Thí nghiệm được tiến hành như sau: 7 ml DPPH (nồng độ $8,8 \cdot 10^{-5}$ M, được pha trong ethanol) được thêm vào các ống nghiệm chứa một phần thể tích dung dịch của dịch chiết DC3 có nồng độ khác nhau (trong khoảng $1 \div 11$ $\mu\text{g/L}$). Sau đó, thêm ethanol vào các ống nghiệm sao cho tổng thể tích đạt được là 10 mL. Lắc đều các ống nghiệm và ủ trong bóng tối trong vòng 30 phút. Cuối cùng, các dung dịch này được tiến hành ghi phổ UV-Vis ở bước sóng 517 nm trên thiết bị UV-Vis (model S80, hãng Biochorm, Anh). Trong nghiên cứu này, axit gallic (vitamin C) cũng được phân tích đồng thời để đối chứng.

Phần trăm bắt gốc tự do DPPH (P, %) của các mẫu thử được xác định theo công thức dưới đây:

$$P = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó: A_0 là giá trị mật độ quang của 10 mL dung dịch DPPH không chứa dịch chiết, được đánh số 0; A là giá trị mật độ quang của mẫu thí nghiệm tương ứng, được đánh số từ 1 đến 7;

Từ các giá trị P thu được, ta tiến hành xây dựng phương trình tương quan thể hiện sự phụ thuộc nồng độ dung dịch của dịch chiết với phần trăm bắt gốc tự do, từ đó xác định chính xác được giá trị IC_{50} , là giá trị nồng độ của dịch chiết mà tại đó mẫu có thể bắt giữ 50% gốc tự do của DPPH.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả lựa chọn điều kiện chiết xuất

Từ các kết quả thực nghiệm, hiệu suất của quá trình chiết xuất đã được tính toán. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bên cạnh đó, để xác định điều kiện chiết xuất phù hợp, quy trình xác định hàm lượng polyphenol tổng đã được tiến hành. Phương trình đường chuẩn của axit gallic xác định được như sau: $y = 0,0024x + 0,0112$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,995$.

Từ phương trình đường chuẩn của axit gallic, hàm lượng polyphenol tổng của cao chiết vỏ lựu khi được chiết xuất ở các điều kiện khác nhau (DC1 và DC2) đã được xác định và thể hiện trong Bảng 1.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy, dịch chiết DC1 chứa hàm lượng polyphenol tổng cao hơn so với DC2. Tuy nhiên, vì giá trị hiệu suất chiết xuất DC1 quá nhỏ (0,38%) so với DC2 (7,6%), như vậy, điều kiện chiết xuất DC2 được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo, do tiết kiệm được chi phí nguyên vật liệu và giảm thiểu việc sử dụng dung môi. Mặt khác, hàm lượng của polyphenol quyết định rất lớn đến khả năng chống oxy hóa của dịch chiết. Do đó, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) là chỉ tiêu quan trọng cần làm giàu trong dịch chiết vỏ lựu. Kết quả tính toán cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng sau khi được làm giàu từ DC2 tăng lên một cách đáng kể (từ $79,54 \pm 0,22\%$ mg GAE/g lên $122,2 \pm 0,23$ mg GAE/g). Cùng với kết quả thu được ở nghiên cứu này, có thể thấy, hàm lượng TPC thu được trong vỏ quả lựu được tiêu thụ ở nước ta (189,97 mg GAE/g [7]; 142,78 mg GAE/g, 97,85 mg GAE/g [8] cao hơn đáng kể hàm lượng TPC trong vỏ quả lựu ở một số nước trên thế giới ($48,92 \div 61,38$ mg GAE/g) [11-13].

3.2. Xác định hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết

Quá trình chống oxy hóa của các hợp chất chứa polyphenol có thể diễn ra theo 3 cơ chế (i) HAT

Bảng 1. Giá trị hiệu suất chiết xuất và hàm lượng polyphenol tổng tương ứng có trong dịch chiết

Tên mẫu chiết	Khối lượng vỏ lựu ban đầu, g	Khối lượng dịch chiết, g	Hiệu suất (%)	Tổng polyphenol (%)
DC1	2000	7,6	0,38	$106,7 \pm 0,19\%$ mg GAE/g*
DC2	2000	150	7,5	$79,54 \pm 0,22\%$ mg GAE/g*

*: mg tương đương axit gallic/gam mẫu

Nguồn: Kết quả nghiên cứu của tác giả

(chuyển nguyên tử hydro); (ii) SET-PT (chuyển electron chưa ghép đôi theo sự chuyển giao proton) hoặc (iii) SPLET (cơ chế chuyển proton mất electron) [14].

Dịch chiết sau khi được làm giàu (mẫu DC3) đã được xác định phần trăm bắt gốc tự do với DPPH. Kết quả xác định hoạt tính chống oxi hóa của dịch chiết được thể hiện trên Bảng 2.

Từ các giá trị thu được ở Bảng 2, dùng phần mềm Excel ta xây dựng được đồ thị thể hiện mối tương quan giữa phần trăm bắt gốc tự do của dịch chiết (P, %) với nồng độ của dung dịch (Hình 2). Kết quả tính toán đã xác định được phương trình phụ thuộc tuyến tính của phần trăm bắt gốc tự do (P, %) vào nồng độ của dung dịch DC3 ($\mu\text{g/mL}$) như sau: $y = 12,977 \cdot x + 3,5562$, với hệ số hồi quy R^2 bằng 0,97.

Từ phương trình tương quan ở trên ta xác định được giá trị IC_{50} là $\mu\text{g/mL}$, giá trị này cho thấy khả năng chống oxi hoá của dịch chiết lựu thu được trong nghiên cứu này bằng $3,58 \mu\text{g/mL}$ và phù hợp với giá trị IC_{50} đã được nghiên cứu trước đó [9]. Giá trị IC_{50} của mẫu đối chứng dương (vitamin C) cũng được xác định đồng thời để đối chứng. Kết quả tính toán cho thấy, giá trị IC_{50} của mẫu đối chứng dương là $3,12 \mu\text{g/mL}$ thấp hơn giá trị IC_{50} của dịch chiết không nhiều, chứng tỏ hoạt tính chống oxi hóa hiệu quả của mẫu dịch chiết từ vỏ lựu trong nghiên cứu này.

4. Kết luận

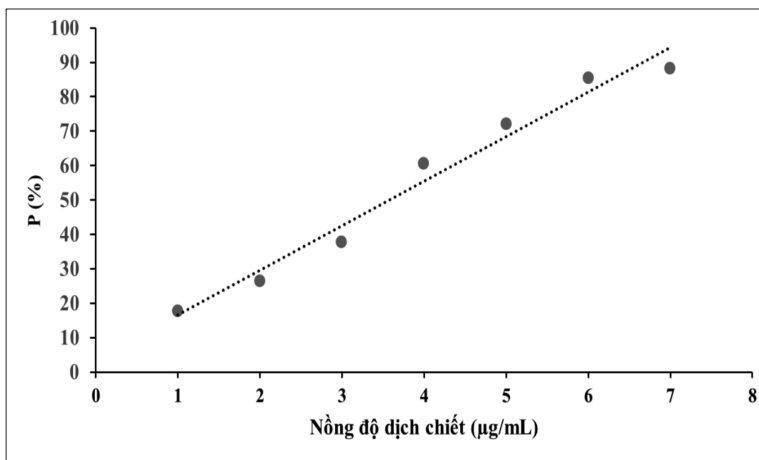
Trong nghiên cứu này, dịch chiết từ vỏ quả lựu đã được chiết xuất và làm giàu tại điều kiện tương đối đơn giản trong phòng thí nghiệm, cụ thể, tại nhiệt độ phòng, thời gian chiết 24 giờ trong dung môi ethanol 96 %. Dịch chiết thu được có hàm

Bảng 2. Kết quả xác định phần trăm bắt gốc tự do (giá trị P, %) phụ thuộc vào nồng độ của dung dịch chứa dịch chiết DC3

Mẫu	Nồng độ của dịch chiết DC3 ($\mu\text{g/mL}$)	P (%)
1	1	17,84
2	2	26,39
3	4	37,82
4	6	60,58
5	8	72,00
6	10	85,36
7	11	88,25

Nguồn: Kết quả nghiên cứu của tác giả

Hình 2: Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa phần trăm bắt gốc tự do P (%) với nồng độ của dịch chiết DC3



Nguồn: Kết quả nghiên cứu của tác giả

lượng tổng polyphenol đạt được $122,2 \pm 0,23 \text{ mg GAE/g}$ và thể hiện khả năng chống oxi hóa tương đối tốt khi bắt gốc tự do của DPPH với giá trị IC_{50} đạt được gần tương đương với giá trị tương ứng của vitamin C. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng, giá trị khai thác và hiệu quả sử dụng của vỏ quả lựu - nguồn phụ phẩm nông nghiệp to lớn của nước ta ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong khuôn khổ nhiệm vụ có mã số NCXS 01.01/22-24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Trần Thị Tuyết Hoa, Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt và Nguyễn Trọng Tuấn. (2021). Sử dụng thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu (*punica granatum*) phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng (*litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 57, 160-168.
2. 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*), Tập 9 (04), 7-14.
3. Nguyễn Thị Vân, Nguyễn Thị Anh Thư, Trần Thị Phương Hạnh, Nguyễn Thị Tâm. (2023). Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất từ vỏ lựu, bã nho và hạt đu đủ. Tạp chí Trường Đại học Tây Nguyên, số 59, 76-83.
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, 516(54), 56-67.
5. Cheng J., Li J., Xiong R.G. et al. (2023). Bioactive compounds and health benefits of pomegranate: An updated narrative review. Food BioScience, 53, 102629.
6. Saporbekova A.A., Kantureyeva G.O., Kudasova D.E. et al. (2023). Potential of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) by-product with significant antioxidant and therapeutic effects: A narrative review. Saudi Journal of Biological Sciences, 30(2), 103553.
7. Chen X., Zhang H., Li J., Chen L. (2021). Analysis of chemical compounds of pomegranate peel polyphenols and their antibacterial action against *Ralstonia solanacearum*. South African Journal of Botany, 140, 4-10.
8. Singh J., Hamita P.K., Anjali V., et al. (2023). Pomegranate Peel Phytochemistry, Pharmacological Properties, Methods of Extraction, and Its Application: A Comprehensive Review. ACS Omega, 8 (39), 35452–35469.
9. Pirzadeh M., Caporaso N., Rauf A. et al. (2021). Pomegranate as a source of bioactive constituents: A review on their characterization properties and applications, National Center for Biotechnology Information, 61(6), 982-999.
10. 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, 40, 255-260.
11. Salama A.A., Ismael N.M., Bedewy M. (2021). The Anti-inflammatory and Antiatherogenic In Vivo Effects of Pomegranate Peel Powder: From Waste to Medicinal Food. Journal of Medicinal Food, 24 (2), 145-150.
12. Saleh M., Amro L., Barakat H. et al. (2021). Fruit by-product processing and bioactive compounds. J. Food Qual, 5513358, DOI: 10.1155/2021/5513358.
13. Omer H. A., Abdel-Magid S. S., Awadalla I. M. (2019). Nutritional and chemical evaluation of dried pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and studying the impact of level of inclusion in ration formulation on productive performance of growing Ossimi lambs. Bull. Natl. Res. Cent, 43, 1-10, DOI: 10.1186/s42269-019-0245-0.
14. Farrokhnia M.. (2020). Density Functional Theory Studies on the Antioxidant Mechanism and Electronic Properties of Some Bioactive Marine Meroterpenoids: Sargahydroquionic Acid and Sargachromanol. ACS Omega, 5(32): 20382–20390 <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02354>.

Ngày nhận bài: 27/8/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 11/9/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 28/9/2024

Thông tin tác giả:

1. NGUYỄN THỊ XUYỀN^{1,2}

2. PHẠM HÀ VINH KHÁNH¹

3. LÊ TRIỆU HUY¹

4. BUI THỊ THU TRANG³

5. NGUYỄN TUẤN ANH¹

6. TRẦN VĂN DŨNG⁴

7. PHẠM THỊ LAN^{1,2*}

¹Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

⁴Viện Nghiên cứu Cơ khí

OBTAINING ANTIOXIDANT EXTRACT FROM POMEGRANATE PEEL

● NGUYEN THI XUYEN^{1,2}

● PHAM HA VINH KHANH¹

● LE TRIEU HUY¹

● BUI THI THU TRANG³

● NGUYEN TUAN ANH¹

● TRAN VAN DUNG⁴

● PHAM THI LAN^{1,2}

¹Institute for Tropical Technology,

Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology,

Vietnam Academy of Science and Technology

³Hanoi University of Industry

⁴National Research Institute of Mechanical Engineering

ABSTRACT:

Natural antioxidant compounds have garnered significant attention for their potential in disease prevention and safety for human health. This study focuses on the extraction and evaluation of antioxidant activity from pomegranate peel. Using 96% ethanol as the solvent, the extraction process was conducted at room temperature for 24 hours, yielding an enriched extract with a total polyphenol content of 122.2 ± 0.23 mg GAE/g. The antioxidant capacity of the extract was assessed using the DPPH free radical scavenging assay, resulting in an IC_{50} value of $3.58 \mu\text{g/mL}$, comparable to that of vitamin C ($IC_{50} = 3.12 \mu\text{g/mL}$). These findings highlight the potential of pomegranate peel extract as a potent natural antioxidant.

Keyword: antioxidant activity, extract, pomegranate peel.