

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ SƠ BỘ ĐỊNH LƯỢNG
PHENOLIC, FLAVONOID TOÀN PHẦN
TRONG DƯỢC LIỆU THÙ LÙ CẠNH (*Physalis angulata*)**

**Nguyễn Huỳnh Kim Ngân, Nguyễn Thành Duy,
Lê Thị Nhân Duyên, Nguyễn Thị Ngọc Vân***

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

**Email: nguyenthingocvanct@gmail.com*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Thù lù cạnh (*Physalis angulata*) là thực vật thuộc họ Solanaceae có nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý, được nghiên cứu để đánh giá tính kháng oxy hóa và phân tích tổng hàm lượng phenolic, flavonoid trên các bộ phận khác nhau (lá, đài, quả). **Mục tiêu nghiên cứu:** (1) Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH và phương pháp năng lực khử; (2) Sơ bộ định lượng phenolic, flavonoid toàn phần bằng phương pháp quang phổ UV – Vis. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Lá, đài và quả của cây thù lù cạnh thu hái tại Rạch Giá, Kiên Giang được chiết siêu âm với MeOH:H₂O (70:30). Dịch chiết được đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH và năng lực khử. Hàm lượng phenolic tổng bằng phương pháp Folin-Ciocalteu và flavonoid tổng bằng phương pháp định lượng đo màu bằng nhôm clorua. **Kết quả:** Dịch chiết lá có tính kháng oxy hóa cao với IC₅₀ thấp nhất (383,2 ppm) và EC₅₀ thấp nhất (586,5 ppm), tổng hàm lượng phenolic và flavonoid dịch chiết là 28,32 mg / g axit gallic và 63,69 mg / g quercetin. **Kết luận:** Nghiên cứu đã chỉ ra tiềm năng kháng oxy hóa của dịch chiết lá, quả, đài trong cây thù lù cạnh.

Từ khóa: Thù lù cạnh, kháng oxy hóa, hàm lượng phenolic toàn phần, hàm lượng flavonoid toàn phần.

ABSTRACT

**TOTAL PHENOLIC, TOTAL FLAVONOID CONTENT AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CUTLEAF GROUNDCHERRY
(*Physalis angulata*)**

**Nguyen Huynh Kim Ngan, Nguyen Thanh Duy,
Le Thi Nhan Duyen, Nguyen Thi Ngoc Van***

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Cutleaf groundcherry (*Physalis angulata*), a plant under Solanaceae family having many distinct biological activities, were studied to assess antioxidant and to analyze total phenolic, total flavonoid content on different parts (leaves, calyxes, fruits). **Objectives:** (1) Assess

antioxidant activity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin (DPPH) and reducing power assay method; (2) Determine total phenolic and total flavonoid content using UV-Vis spectrometry. **Materials and methods:** Leaves, calyxes and fruits collected from Rach Gia, Kien Giang were extracted by sonication with methanol: water (70:30). The extraction was analyzed using DPPH assay, reducing power assay, Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colorimetric methods, respectively. **Results:** Results demonstrated that leaves extract exhibited as the highest antioxidant activity with lowest IC_{50} (383.2 ppm) and lowest EC_{50} (586.5 ppm), the excessive values on total phenolic and total flavonoid content, with 28.32 mg/g of acid gallic and 63.69 mg/g of quercetin equivalent per gram of dry extract. **Conclusion:** The study indicated that leaves, calyxes and fruits can be deemed as a good candidate for natural plant sources of antioxidants.

Keywords: *Physalis angulata*, antioxidant, total phenolic content, total flavonoid content.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thù lù cạnh (*Physalis angulata*) là một loài thực vật có nhiều tiềm năng hiện đang thu hút các nhà nghiên cứu vì trong cây có chứa hàm lượng lớn các chất kháng oxy hoá [1-3]. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài cây này được thu thập chủ yếu từ Ấn Độ, Indonesia, Ghana, Nigeria.... [4]. Thành phần hóa học chính của cây bao gồm các hợp chất thuộc nhóm steroid thực vật, alkaloid, flavonoid. Đặc biệt là nhóm hợp chất phenolic và flavonoid trong cây, ngoài tác dụng kháng oxy hóa còn cho nhiều tác dụng dược lý khác đáng quan tâm.

Vì thế, để góp phần vào công cuộc nghiên cứu thành phần hóa thực vật trong loài cây này, nghiên cứu “Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và sơ bộ định lượng phenolic, flavonoid toàn phần trong dược liệu Thù lù cạnh (*Physalis angulata*)” được thực hiện với hai mục tiêu cụ thể: (1) Khảo sát khả năng kháng oxy hoá bằng phương pháp DPPH và phương pháp năng lực khử; (2) Sơ bộ định lượng phenolic, flavonoid toàn phần bằng phương pháp quang phổ UV – Vis.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá, đài và quả của cây thù lù cạnh thu hái tại Rạch Giá, Kiên Giang.

2.2. Chất đối chiếu, hóa chất, dung môi, thiết bị

Chất đối chiếu

Chất chuẩn: Acid gallic (hàm lượng > 99%) của Sigma - Aldrich, Quercetin (hàm lượng > 99%) của Sigma – Aldrich.

Hóa chất, dung môi

Thuốc thử 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin (DPPH), đệm phosphat pH 6,6, kali ferricyanid, triacetic acid 10%, sắt (III) chlorid 0,1%, thuốc thử Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 10%, $NaNO_2$ 5%, $AlCl_3$ 10%, NaOH 1M, methanol, n-hexane.

Thiết bị

Máy quang phổ UV Vis Multiskan FC Wo/Inc (Thermo Fisher Scientific), cân phân tích 4 số OHAUS, cân phân tích 5 số ABT 220-5DM, bể siêu âm WUC-D06H (Daihan), máy cô quay Heidolph.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chiết xuất

Cân 0,5 g bột dược liệu (riêng đối với bộ phận dùng là đài cân 0,25 g), chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần 15 phút với 5 ml MeOH:H₂O (70:30). Sau mỗi lần chiết, ly tâm và gộp dịch

trong vào bình định mức 25 ml. Bã được liệu của lần 3 cho thêm 5 ml MeOH vào, lắc vortex rồi ly tâm lấy dịch trong, gộp vào bình định mức. Bổ sung vừa đủ bằng MeOH.

2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa

Phương pháp thử hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Cân 10 mg DPPH vào ống eppendorf 2 mL, hòa tan bằng 1 mL MeOH, siêu âm 30 phút tần số 37 KHz, thu được dung dịch DPPH 10000 ppm (dung dịch gốc). Hút 200 μ L dung dịch DPPH gốc cho vào ống eppendorf 2 mL, bổ sung 800 μ L MeOH, thu được dung dịch DPPH 200 ppm dùng để thử hoạt tính bắt gốc tự do.

Từ dịch chiết lá nồng độ 50.000 ppm, dịch chiết đài 25.000 ppm, dịch chiết quả 50.000 ppm, pha thành các dãy nồng độ tăng dần vào các ống eppendorf riêng, thể tích pha mỗi ống là 1 mL. Rút bỏ 40 μ L dịch chiết mỗi ống, bổ sung vào 40 μ L DPPH 1000 ppm. Ủ 30 phút trong điều kiện không có ánh sáng, sau đó, tiến hành đo mật độ quang OD tại bước sóng 517 nm. Giá trị mật độ quang OD phản ánh khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Chứng âm sử dụng trong nghiên cứu là nước cất hai lần. Tỷ lệ phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa được xác định theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ \% hoạt tính bắt gốc tự do DPPH} = \frac{OD_C - OD_M}{OD_C}$$

Trong đó, OD_m: giá trị mật độ quang OD của mẫu thử;

OD_c: giá trị mật độ quang OD của chứng âm.

Từ tỷ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình hồi quy tương quan, từ đó xác định giá trị IC₅₀ (nồng độ mà tại đó bắt 50% gốc tự do DPPH) làm cơ sở so sánh khả năng kháng oxy hóa giữa các mẫu. Mẫu nào có giá trị IC₅₀ càng thấp thì hoạt tính kháng oxy hóa càng cao.

Phương pháp năng lực khử

Pha 500 μ L dung dịch thử ở các nồng độ khác nhau. Bổ sung thêm vào mỗi ống 500 μ L dung dịch đệm phosphat 0,2M (pH = 6,6), 500 μ L dung dịch kali ferricyanid 1%, ủ ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, mỗi ống eppendorf được bổ sung thêm 500 μ L dung dịch tricloacetic acid 10%, ly tâm nếu xuất hiện tủa với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy 500 μ L dịch ly tâm, thêm 500 μ L nước cất hai lần, bổ sung 100 μ L dung dịch FeCl₃ 0,1%. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 700 nm. Năng lực khử của mẫu được thể hiện thông qua giá trị EC₅₀ (nồng độ của dịch chiết cho giá trị OD = 0,5).

Chứng minh tính đặc hiệu của hai phương pháp

Sử dụng một mẫu trắng là nước cất và một mẫu thử ở nồng độ gần với giá trị IC₅₀ hoặc EC₅₀. Thực hiện phản ứng và tiến hành quét phổ cả hai mẫu trong vùng bước sóng 300 – 800 nm. Đối với phương pháp DPPH, phương pháp được ghi nhận là có tính đặc hiệu khi mẫu thử không còn đỉnh hấp thụ. Đối với phương pháp năng lực khử, phương pháp được ghi nhận là có tính đặc hiệu khi xác định được cực đại hấp thụ của mẫu thử sau phản ứng.

2.3.3. Định lượng các nhóm hợp chất bằng phương pháp UV-Vis

Xác định hàm lượng tổng phenolic (TPC)

Cân 10 mg acid gallic hòa tan bằng nước cất trong bình định mức 10 mL, bổ sung nước cất đến vạch (1000 ppm). Lần lượt pha 250 μ L acid gallic ở các nồng độ 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm vào các ống eppendorf, bổ sung 250 μ L nước cất. Thêm 250 μ L Folin – Ciocalteu (Folin phải được pha loãng ra khoảng 20 lần) và 250 μ L dung dịch Na₂CO₃ 10%, lắc đều, bổ sung nước cất đến vạch, ủ 30 phút ở 40°C. Độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 760 nm. Tiến hành song song 3 mẫu thử lá, đài, quả ở nồng độ dịch chiết 2000 ppm.

Acid gallic được sử dụng như là chất chuẩn và kết quả được biểu diễn:

Số milligram acid gallic/1gam mẫu nguyên liệu

Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính dựa trên các kết quả thu được.

Xác định hàm lượng tổng flavonoid (TFC)

200 μ L mẫu hoặc dung dịch chuẩn quercetin (có nồng độ từ 10 – 60 ppm) được bổ sung vào 200 μ L nước cất, sau đó thêm vào 200 μ L dung dịch NaNO_2 5%. Sau 5 phút thêm tiếp 200 μ L dung dịch AlCl_3 10%, sau 6 phút cho vào 600 μ L dung dịch NaOH 1M, bổ sung thêm 120 μ L nước cất. Độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo ở bước sóng 510 nm. Song song tiến hành 3 mẫu thử lá, đài, quả lần lượt ở các nồng độ 2000, 5000, 10 000 ppm.

Quercetin được sử dụng làm chất chuẩn và kết quả được biểu diễn:

Số milligram quercetin /1 gam mẫu nguyên liệu.

Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính dựa trên các kết quả thu được.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát khả năng kháng oxy hóa

Phương pháp thử hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Bảng 1. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết lá, đài, quả thù lù cạnh

		Lá	Đài	Quả
Khả năng bắt gốc tự do	<i>PT hồi quy</i>	$y = 0,0016x - 0,0951$	$y = 0,0002x - 0,1390$	$y = 0,4193\ln(x) - 2,9702$
	R^2	0,9230	0,9263	0,9689
	IC_{50} (ppm)	371,9	3195,0	3929,1

Nhận xét: Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được xác định thông qua giá trị IC_{50} , được định nghĩa là nồng độ dịch chiết mà tại đó 50% gốc tự do DPPH đã chuyển thành dạng khử. IC_{50} càng thấp, hoạt tính bắt gốc tự do của hợp chất cần phân tích càng cao. Kết quả IC_{50} của các dịch chiết lần lượt là IC_{50} lá = 383,2 ppm, IC_{50} đài = 3195,0 ppm, IC_{50} quả = 3929,1 ppm. Dựa vào kết quả này, có thể sơ bộ kết luận được khả năng bắt gốc tự do của các hợp chất phenolic và flavonoid cùng các nhóm kháng oxy hóa khác trong dịch chiết lá chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là dịch chiết đài và dịch chiết quả.

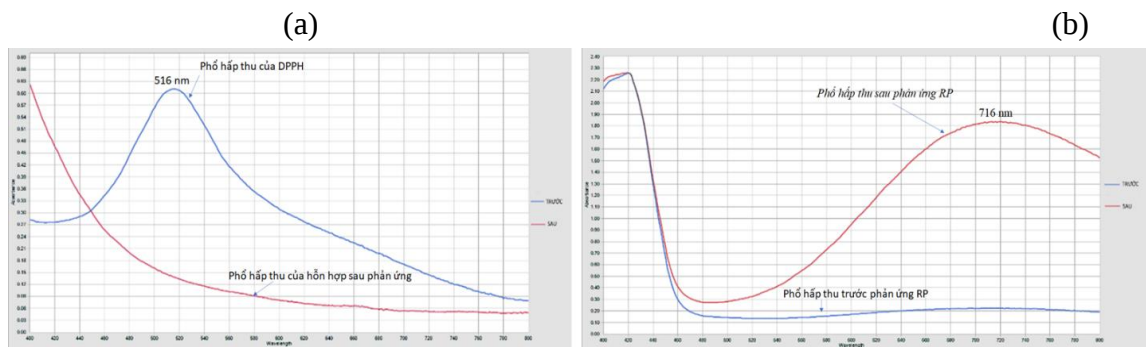
Phương pháp năng lực khử

Bảng 2. Năng lực khử của dịch chiết lá, đài, quả thù lù cạnh

		Lá	Đài	Quả
Năng lực khử	<i>PT hồi quy</i>	$y = 0,0006x + 0,1481$	$y = 0,0002x + 0,1545$	$y = 0,0002x + 0,2296$
	R^2	0,9984	0,9372	0,9492
	EC_{50} (ppm)	586,5	1727,5	1352,0

Nhận xét: Năng lực khử của các dịch chiết được biểu thị thông qua giá trị EC_{50} , là nồng độ dịch chiết tương ứng với độ hấp thụ 0,5. Giá trị EC_{50} càng thấp, năng lực khử dịch chiết càng lớn. Năng lực khử của các dịch chiết lần lượt là EC_{50} lá = 586,5 ppm, EC_{50} đài = 1727,5 ppm, EC_{50} quả = 1352,0 ppm.

Kết quả chứng minh tính đặc hiệu của hai phương pháp



Hình 1: Chứng minh tính đặc hiệu của phương pháp DPPH (a) và phương pháp năng lực khử (b)

Nhận xét: Phương pháp DPPH đạt tính đặc hiệu với bước sóng hấp thụ 516 nm và 716 nm đối với phương pháp năng lực khử.

3.2. Kết quả định lượng phenolic (TPC) và flavonoid toàn phần (TFC)

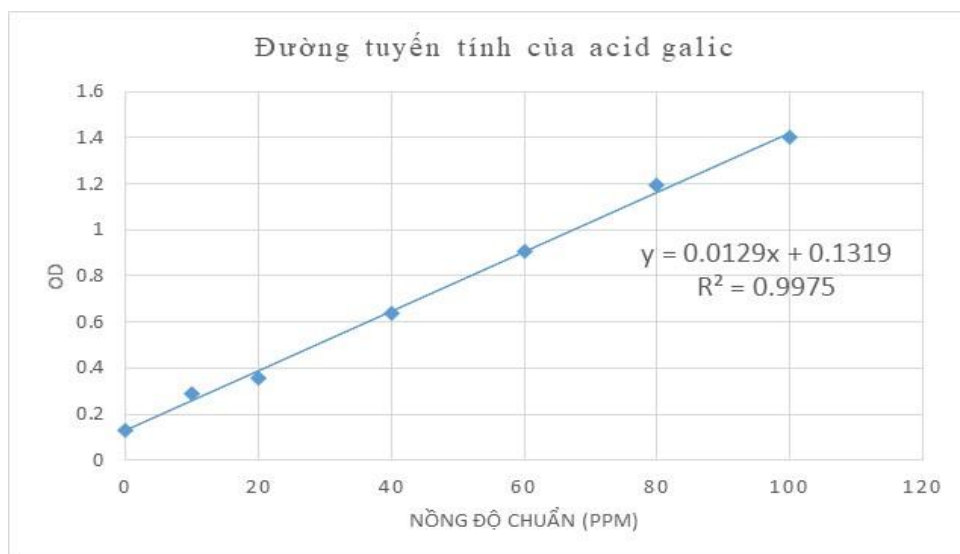
Kết quả chứng minh tính đặc hiệu của hai phương pháp

Cả hai phương pháp đạt tính đặc hiệu với bước sóng cực đại lần lượt với phương pháp TPC và TFC là 765 nm và 510 nm.

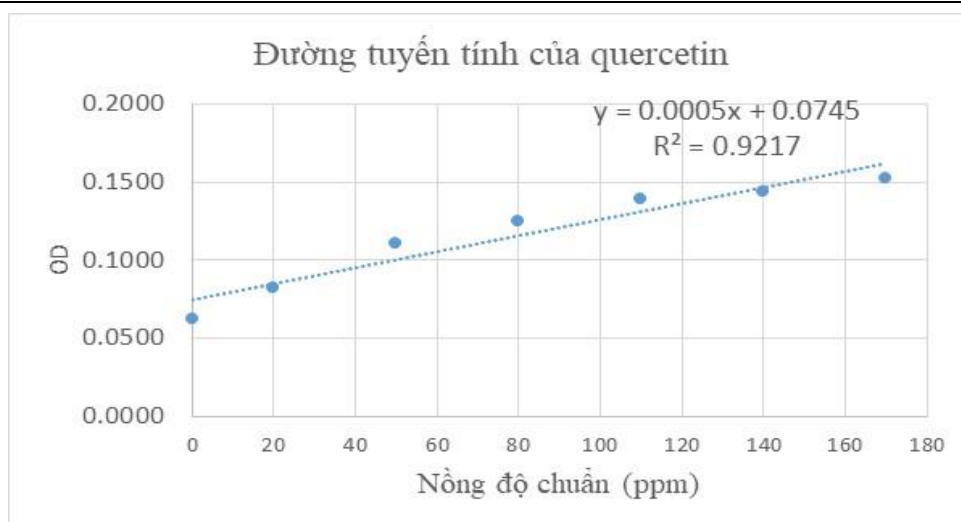
Khoảng tuyến tính

Phương pháp định lượng phenolic tổng (TPC) với chất chuẩn là acid gallic, cho độ tuyến tính trong khoảng 10 – 100 ppm với $R^2 = 0,9975$.

Phương pháp định lượng flavonoid tổng (TFC) với chất chuẩn là quercetin cho độ tuyến tính trong khoảng 20 – 170 ppm với $R^2 = 0,9217$



Hình 2. Đường tuyến tính acid gallic chuẩn



Hình 3. Đường tuyến tính của quercetin chuẩn

Kết quả hàm lượng tổng phenolic (TPC)

Bảng 3. Hàm lượng tổng phenolic trong dịch chiết lá, quả, đài thù lù cạnh

Dịch chiết	Nồng độ dịch chiết (ppm)	OD trung bình	Nồng độ (ppm)	Hệ số quy đổi lượng cân	Hàm lượng (mg/g)
Lá	2000	0,4607	57,67	0,982	28,32
Đài	2000	0,2791	11,41	1,046	5,97
Quả	2000	0,3085	13,69	1,044	7,15

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng phenolic tổng ở lá là 28,32 mg/g, cao hơn gấp bốn lần so với dịch chiết đài và dịch chiết quả (lần lượt là 5,97 và 7,15 mg/g).

Kết quả hàm lượng tổng flavonoid (TFC)

Bảng 4. Hàm lượng tổng flavonoid trong dịch chiết lá, quả, đài Thù lù cạnh

Dịch chiết	Nồng độ dịch chiết (ppm)	OD trung bình	Nồng độ (ppm)	Hệ số quy đổi lượng cân	Hàm lượng (mg/g)
Lá	2000	0,1490	147,10	0,886	63,69
Đài	5000	0,1159	80,90	1,046	16,92
Quả	10000	0,1454	139,9	1,044	14,61

Hàm lượng flavonoid tổng trong các dịch chiết lá, đài quả lần lượt là 63,69 mg/g, 16,92 mg/g, 14,61 mg/g.

IV. BÀN LUẬN**4.1. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa**

Khả năng kháng oxy hóa của nghiên cứu tương đối thấp hơn so với nghiên cứu của Medina và cộng sự [5] ($IC_{50} = 38,74$ ppm). Có thể lý giải sự khác biệt này là do tác giả của bài viết trên đánh giá hoạt tính bắt gốc tự do DPPH trên cao chiết tổng, còn trong chuyên đề hiện tại hoạt tính này chỉ được đánh giá trên dịch chiết định hướng cho nhóm phenolic và nhóm flavonoid mà không có sự góp mặt của những nhóm hợp chất khác. Ngoài ra, trong dịch chiết quả, phương trình hồi quy khả năng bắt gốc tự do DPPH theo nồng độ là một phương trình logaric. Nguyên nhân là do khả năng đáp ứng của một số hợp chất với DPPH đã được chứng minh là không tuyến tính [6]. Có thể thấy rằng so với các bộ phận dùng khác, dịch chiết lá có năng lực khử cao nhất. Tuy nhiên, thứ tự từ cao đến

thấp của năng lực khử không tương ứng với thứ tự khả năng bắt gốc tự do DPPH. Điều này phản ánh phần nào tính không điển hình của các nghiệm pháp trên, đó là lý do cần phải thực hiện nhiều nghiệm pháp bổ sung cho nhau để đánh giá chính xác khả năng kháng oxy hóa của các hợp chất có trong thực vật.

4.2. Kết quả định lượng phenolic (TPC) và flavonoid toàn phần (TFC)

Phương pháp định lượng phenolic tổng (TPC) với chất chuẩn là acid gallic, cho độ tuyến tính trong khoảng 10 – 100 ppm với $R^2 = 0,9975$. Không xuất hiện sai số thô sau khi kiểm tra bằng Dixon test. Phương pháp định lượng flavonoid tổng (TFC) với chất chuẩn là quercetin cho độ tuyến tính trong khoảng 20 – 170 ppm với $R^2 = 0,9217$. Như vậy, cả hai phương pháp đều phù hợp với mô hình hồi quy tuyến tính, và có thể dùng phương trình hồi quy để ngoại suy nồng độ các chất cần phân tích

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng phenolic tổng ở lá là 28,32 mg/g. Kết quả này cao hơn rất nhiều so với kết quả thu được từ cây thù lù cạnh thu hái ở Durango, Mexico, với hàm lượng phenolic tổng trung bình ở các dịch chiết lá, đài, quả lần lượt vào khoảng 1,79 – 4,98 mg/g, 2,42 – 4,87 mg/g, 1,10 – 1,22 mg/g [7].

Hàm lượng flavonoid tổng trong các dịch chiết lá, đài quả lần lượt là 63,69 mg/g, 16,92 mg/g, 14,61 mg/g. Kết quả này cao hơn hẳn so với hàm lượng flavonoid trong cây thù lù cạnh ở Durango, Mexico [7], với hàm lượng ở dịch chiết lá và đài lần lượt là 37,86 mg/g và 14,33 mg/g. Đáng chú ý là khi so sánh với kết quả của bài báo trên, trong khi Cobaleda và cộng sự (2017) kết luận rằng không thể tìm thấy flavonoid ở dịch chiết quả, thì nghiên cứu này cho kết quả hàm lượng flavonoid tổng ở quả khoảng 14,61 mg/g. Điều này chứng minh được rằng sự khác biệt về phân bố địa lý có ảnh hưởng sâu sắc đến hàm lượng các hợp chất kháng oxy hóa chứa trong cây *Physalis angulata*.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá năng lực kháng oxy hóa của các hợp chất có trong cây thù lù cạnh bằng 2 phương pháp DPPH và phương pháp năng lực khử, với các giá trị IC_{50} và EC_{50} lần lượt là IC_{50} lá = 383,2 ppm, IC_{50} đài = 3195,0 ppm, IC_{50} quả = 3929,1 ppm, EC_{50} lá = 586,5 ppm, EC_{50} đài = 1727,5 ppm, EC_{50} quả = 1352,0 ppm. Hàm lượng phenolic trong cây ở các dịch chiết lá, đài, quả lần lượt là 28,32 mg/g, 5,97 mg/g và 7,15 mg/g, trong khi hàm lượng flavonoid ở các dịch chiết kể trên lần lượt là 63,69 mg/g, 16,92 mg/g, 14,61 mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập 2, nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội, tr. 792-793
2. Phạm Hoàng Hộ (2003), Cây cỏ Việt Nam, Nhà xuất bản Trẻ, tr. 764 – 765
3. Phạm Vũ Nhật (2019), Cơ chế kháng oxy hóa của các polyphenol, Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ, tập 55, số 1A, tr 54-58.
4. Ayodhyareddy P, Rupa P (2016), “Ethno Medicinal, Phyto Chemical and Therapeutic Importance of *Physalis angulata* L.: A Review”, *International Journal of Science and Research*, 5, pp. 2122 – 2127.
5. Medina-Medrano JR, Almaraz-Abarca N, González-Elizondo S, Uribe-Soto NJ, González-Valdez LS, Herrera-Arrieta Y (2015), “Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae)”, *Bot Stud*, 56:24, pp. 1 – 13.
6. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995), *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, *Food Sci Technol* 28, pp. 25–30.

7. Cobaleda-Velasco M, Alanis-Bañuelos RE, Almaraz-Abarca N, Rojas-López M, González-Valdez L, Ávila-Reyes JA, Rodrigo S (2017) “*Phenolic profiles and antioxidant properties of Physalis angulata L. as quality indicators*”, Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 5 (2), pp. 114-128

(Ngày nhận bài: 09/11/2020 - Ngày duyệt đăng: 26/12/2020)
