

RESEARCH COMPLETING THE PROCESS OF FLAVONOID COMPOUND FRACTIONAL EXTRACTION FROM ANOECTOCHILUS SETACEUS BLUME CAO BANG PLANT

Nguyen Thuong Tuan*, Nguyen Van Hong

TNU - Institute of life sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 22/4/2021 Revised: 31/7/2021 Published: 31/7/2021	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume Cao Bang is one of the most valuable and rare medicinal plants on the market today. However, the extraction of pharmacological ingredients from this medicinal plant is still limited. To improve the efficiency of the process of extracting flavonoid active ingredients in <i>Anoectochilus setaceus</i> Blume Cao Bang, the study conducted experiments with different thresholds of technical parameters (solvent concentration, time, temperature, materials/solvents ratio) in the extraction procedure. The results showed that the total Flavonoid content obtained from 100 grams of <i>Anoectochilus setaceus</i> Blume Cao Bang leaf, stem material reached 1184.98 ± 55.60 mg when mixing the ratio of material/solvent was 1/15 and extract solvent ethanol 60° at the temperature of 90°C for 90 minutes. The research results are used to produce high flavonoid fraction from <i>Anoectochilus setaceus</i> Blume Cao Bang material, paving the way for further research and development of functional products, cancer prevention, treatment products.
KEYWORDS Anoectochilus setaceus Blume Flavonoid Solvent Temperature Time	

NGHIÊN CỨU HOÀN THIỆN QUY TRÌNH CHIẾT PHÂN ĐOẠN HỢP CHẤT GIÀU FLAVONOID TỪ LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus setaceus* Blume) CAO BẰNG

Nguyễn Thương Tuấn*, Nguyễn Văn Hồng

Viện Khoa học Sự sống – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 22/4/2021 Ngày hoàn thiện: 31/7/2021 Ngày đăng: 31/7/2021	Cây Lan Kim Tuyến (<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume) Cao Bằng là một trong những loài dược liệu quý, hiếm và có giá trị nhất trên thị trường hiện nay. Tuy nhiên, việc chiết xuất hoạt chất có giá trị dược liệu từ sinh khối loài Lan này còn nhiều hạn chế. Để nâng cao hiệu quả của quy trình chiết xuất hoạt chất flavonoid trong Lan Kim Tuyến Cao Bằng, nghiên cứu thực hiện thử nghiệm với các ngưỡng thông số kỹ thuật khác nhau (nồng độ dung môi, thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi) trong quy trình chiết. Kết quả cho thấy, hàm lượng Flavonoid tổng số thu được từ 100 gram nguyên liệu thân lá Lan Kim Tuyến Cao Bằng đạt $1184,98 \pm 55,60$ mg khi phối trộn tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/15 và dung môi chiết Etanol 60°, ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 90 phút. Kết quả nghiên cứu được sử dụng để sản xuất cao phân đoạn Flavonoid từ nguyên liệu Lan Kim Tuyến, tạo tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo và phát triển các sản phẩm chức năng, sản phẩm phòng và điều trị bệnh ung thư.
TỪ KHÓA Lan Kim Tuyến Flavonoid Dung môi Nhiệt độ Thời gian	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4414>

* Corresponding author. Email: nguyenthuongtuan@tuaf.edu.vn

1. Mở đầu

Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) được biết đến với các tên đồng nghĩa là: *Chrysobaphus roxburghii* Wall. (1826); *Anoectochilus roxburghii* Wall ex Lindl. (1840) và *Anoectochilus regalis* Blume (1858). Ở Việt Nam, Lan Kim Tuyền còn được gọi là Lan Kim Cương, Kim Tuyền tở, Lan gấm, Mộc sơn. Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) thuộc Bộ Asparagales, họ phong lan (Orchidaceae), phân họ (Orchidales), chi Kim tuyến (*Anoectochilus*), loài *A.setaceus*. Cây ra hoa vào tháng 2-4, thường tái sinh từ chồi, từ thân rễ và hạt. Đây là một trong những loài lan quý hiếm, sinh trưởng rất chậm dưới tán rừng, trên sườn núi đá granit, riolit, phiến sét, ở độ cao 500 - 1600 m, rải rác thành từng nhóm vài ba cây trên đất ẩm, rất giàu mùn và lá cây rụng [1].

Trên thế giới, Lan Kim Tuyền phân bố ở Trung Quốc (Vân Nam, Quảng Đông), Ấn Độ, Indonexia. Ở Việt Nam, chúng phân bố hẹp tại một số địa phương như Hải Phòng, Lào Cai, Tam Đảo, Quảng Trị, Kon Tum, Gia Lai, Sơn La, Yên Bái,...

Lan Kim Tuyền là một trong những dược thảo quý, giúp dưỡng âm, bổ máu. Trong các y học cổ truyền, Lan Kim Tuyền sắc uống, giúp chữa trị một số bệnh như đau bụng, đau ruột, sốt cao, hoặc đắp bên ngoài chỗ vết thương bị rấn cắn, các chỗ sưng, tăng cường sức khỏe, bổ máu; chủ trị bệnh phổi, di tinh, yếu gan, yếu tỳ. Ngoài ra, cây Lan Kim Tuyền có tính kháng khuẩn, giúp chữa các bệnh viêm gan mãn tính, bệnh viêm khí quản, thần kinh suy nhược, đau lưng, phong thấp, chữa ho khan, đau họng, cao huyết áp, suy thận, làm tiêu đờm, giải độc. Ngày nay, các nhà khoa học đã xác định được trong sinh khối của loài cây này có nhiều hoạt chất có giá trị dược liệu cao nhóm Flavonoid (Quercetin, Isorhamnetin), nhóm Steroid, Polysaccharides 13,32%, Oligosaccharides 11,24% và đường đơn 9,73%, Alkaloid và nhiều nguyên tố vi lượng và các khoáng chất khác [2], [3].

Tác giả Đỗ Thị Gấm (2017) [4] đã chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số từ 3 loài Lan Kim Tuyền của Việt Nam, kết quả cho thấy hợp chất Flavonoid được tích lũy chủ yếu ở lá cây Lan Kim Tuyền. Đặc biệt, Quercetin và Isorhamnetin thuộc nhóm Flavonoid và Quercetin đóng vai trò như một chất giúp ngăn ngừa và điều trị ung thư một cách hiệu quả; ngoài ra có chức năng cải thiện sức khỏe tim mạch, làm giảm lượng cholesterol giúp ngăn ngừa xơ vữa động mạch, ngăn ngừa đột quỵ và một số bệnh liên quan về tim mạch [5]-[7]. Theo nghiên cứu của Lê Đình Chấn (2019) về thành phần hóa học và vai trò của Quercetin, Isorhamnetin và Acid ferulic trong hỗ trợ nâng cao sức khỏe con người trong Lan Kim Tuyền tại Việt Nam thì trong nhóm Flavonoid hoạt chất Isorhamnetin lại có khả năng ngăn ngừa tổn thương các tế bào trong cơ thể, hoạt động như một chất chống oxi hóa mạnh mẽ. Isorhamnetin được coi như một hoạt chất chống ung thư nhờ vào khả năng ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư [8]-[10].

Ngoài ra, Quercetin cũng là một hoạt chất rất tốt dành cho bệnh nhân bị tiểu đường và cao huyết áp. Với khả năng chống viêm của mình cũng như khả năng làm bền thành mạch chống tai biến mạch máu não. Đây cũng là một hoạt chất quý đóng vai trò quan trọng trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh tiểu đường và các biến chứng của bệnh tiểu đường [11]-[13].

Hiện nay, sản lượng Lan Kim Tuyền ở nước ta còn rất thấp, việc nuôi trồng và thu sinh khối còn rất hạn chế, mới chỉ đang tiến hành thử nghiệm ở một số tỉnh. Nguồn nguyên liệu Lan Kim Tuyền cung cấp cho ngành dược nước ta chủ yếu từ nhập nội hoặc khai thác nhỏ lẻ trong tự nhiên. Vì vậy, việc nâng cao hiệu suất trong chiết xuất hoạt chất có giá trị dược lý là rất cần thiết. Trước thực trạng này, nhóm nghiên cứu tiến hành “Nghiên cứu quy trình chiết xuất phân đoạn giàu hợp chất flavonoid từ cây Lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) Cao Bằng. Nghiên cứu sẽ tối ưu hóa quá trình chiết xuất Lan Kim Tuyền Cao Bằng bằng phương pháp chiết siêu âm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Xử lý mẫu

Cây Lan Kim Tuyền Cao Bằng (gồm: Thân, Lá) được thu thập và rửa sạch, loại bỏ phần hư hỏng, sau đó tiến hành sấy thăng hoa trên thiết bị VirTis Bench Top ở nhiệt độ -40°C trong thời gian 24 giờ. Kết thúc quá trình sấy, độ ẩm mẫu đạt từ 7 - 10%.

2.2. Chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số

Mẫu Lan Kim Tuyền được chiết trên máy siêu âm Sonica, sử dụng phương pháp B.C. Talli làm nền với sự biến động của các yếu tố trong các thử nghiệm cụ thể như sau:

Thử nghiệm 1: Nghiên cứu xác định dung môi trích ly phù hợp: Các loại dung môi chiết thử nghiệm gồm: Nước, Etanol 98% và Etanol 60%.

Thử nghiệm 2: Nghiên cứu xác định nhiệt độ trích ly phù hợp: Các mức nhiệt độ thử nghiệm gồm: 40°C , 50°C và 60°C .

Thử nghiệm 3: Nghiên cứu xác định thời gian trích ly phù hợp: Các ngưỡng thời gian trích ly là 60 phút, 90 phút và 120 phút.

Thử nghiệm 4: Nghiên cứu xác định tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp: Các tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thử nghiệm lần lượt là 1/10, 1/15 và 1/20 (w/v).

Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần. Dịch chiết được tinh sạch, sau đó xác định hàm lượng Flavonoid tổng số theo phương pháp khối lượng của B.C. Talli.

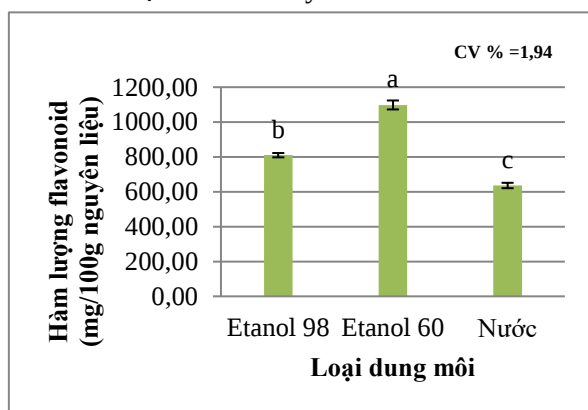
2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được tại các thử nghiệm được xử lý thống kê để xác định sự sai khác giữa các công thức. Xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.1 và giá trị trung bình được so sánh theo phương pháp Duncan.

3. Kết quả và thảo luận

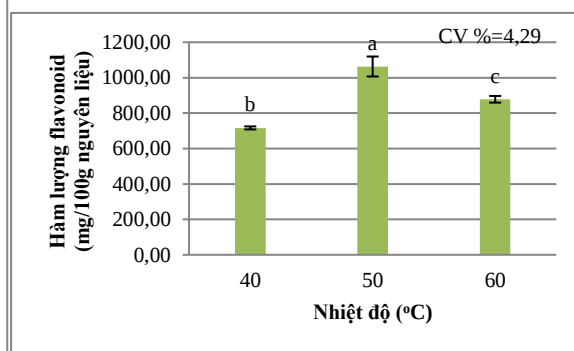
3.1. Xác định dung môi trích ly

Khi trích ly mẫu Lan Kim Tuyền Cao Bằng khô bằng các dung môi khác nhau thu được hàm lượng Flavonoid khác nhau (Hình 1) ($P \leq 0,05$, CV % = 1,94). Trong đó, các mẫu được chiết bằng Etanol 60% cho hàm lượng Flavonoid cao nhất trung bình đạt được là 1,098 mg/100g nguyên liệu. Các dung môi 98% và nước cho thu được hàm lượng Flavonoid thấp hơn, lần lượt đạt 809,92 và 635,87 mg/100g nguyên liệu. Như vậy, trong ba loại dung môi thử nghiệm thì Etanol 60% cho hiệu suất trích ly Flavonoid cao nhất.



Hình 1. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hàm lượng Flavonoid trích ly từ Lan Kim Tuyền Cao Bằng

Ghi chú: Ký tự (a, b, c) trên đỉnh mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95% (theo phương pháp Duncan, $P \leq 0,05$). Giá trị được $\pm$ SE.



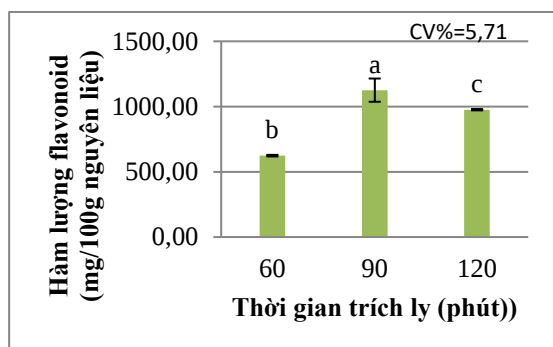
Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ xử lý đến hàm lượng Flavonoid được trích ly từ Lan Kim Tuyền Cao Bằng

Ghi chú: Ký tự (a, b, c) trên đỉnh mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95% (theo phương pháp Duncan, $P \leq 0,05$). Giá trị được $\pm$ SE

3.2. Xác định nhiệt độ trích ly

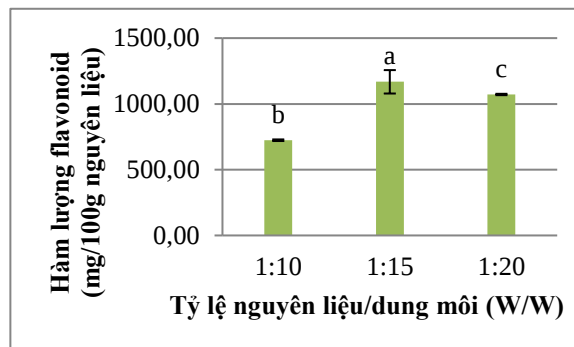
Nhiệt độ trích ly là yếu tố ảnh hưởng lớn đến hàm lượng hoạt chất thu được trong quá trình chiết cao phân đoạn. Kết quả khảo sát nhiệt độ trích ly Flavonoid từ mẫu Lan Kim Tuyền Cao Bằng khô bổ sung thêm minh chứng cho luận điểm này (Hình 2 ($P \leq 0,05$, CV % = 4,29)). Hàm lượng Flavonoid thu được khi khảo sát 3 ngưỡng nhiệt độ trích ly (40, 50 và 60°C) đạt lần lượt là 716,30, 1063,06 và 876,07 mg/100 g nguyên liệu. Như vậy, ở ngưỡng nhiệt độ trích ly là 50°C có hiệu quả nhất trong chiết cao Flavonoid trong 3 ngưỡng nhiệt độ khảo sát.

3.3. Xác định thời gian trích ly



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến hàm lượng Flavonoid được trích ly từ Lan Kim Tuyền Cao Bằng

Ghi chú: Ký tự (a, b, c) trên đỉnh mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95% (theo phương pháp Dulcan, $P \leq 0,05$). Giá trị được $\pm$ SE



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (W/W) đến hiệu suất trích ly Flavonoid từ Lan Kim Tuyền Cao bằng

Ghi chú: Ký tự (a, b, c) trên đỉnh mỗi cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95% (theo phương pháp Dulcan, $P \leq 0,05$). Giá trị được $\pm$ SE.

Kết quả thí nghiệm về thời gian trích ly ảnh hưởng đến hàm lượng Flavonoid thu được trong cao chiết thể hiện ở hình 3 ($P \leq 0,05$, CV % = 5,71). Thời gian trích ly 90 phút cho hàm lượng Flavonoid thu được là cao nhất đạt 1125,84 mg/100g nguyên liệu. Ở các khoảng thời gian trích ly là 120 phút và 60 phút cho cao chiết có hàm lượng Flavonoid đạt thấp hơn, lần lượt là 975,81 và 623,85mg/100 g nguyên liệu. Như vậy, trong 3 khoảng thời gian trích ly khảo sát, 90 phút trích ly là thích hợp nhất trong chiết cao phân đoạn giàu Flavonoid.

3.4. Xác định tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi

Tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình chiết xuất Flavonoid. Kết quả của thí nghiệm với tỉ lệ nguyên liệu / dung môi lần lượt là 1/10; 1/15 và 1/20 (g/ml) được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, khi trộn nguyên liệu/dung môi ở tỉ lệ 1/15 cho hàm lượng Flavonoid thu được cao nhất, đạt 1167,89 mg/100g. Ở các tỉ lệ 1/10 và 1/20 (nguyên liệu/dung môi), lượng Flavonoid chiết được từ 100 g nguyên liệu có giá trị thấp hơn, lần lượt là 723,87 mg và 1071,48 mg. Kết quả nghiên cứu đi đến kết luận, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (v/w) thích hợp nhất trong 3 ngưỡng thử nghiệm chiết xuất Flavonoid từ phần thân và lá là 1/15, hàm lượng Flavonoid đạt được là 1167,89 mg/100g nguyên liệu.

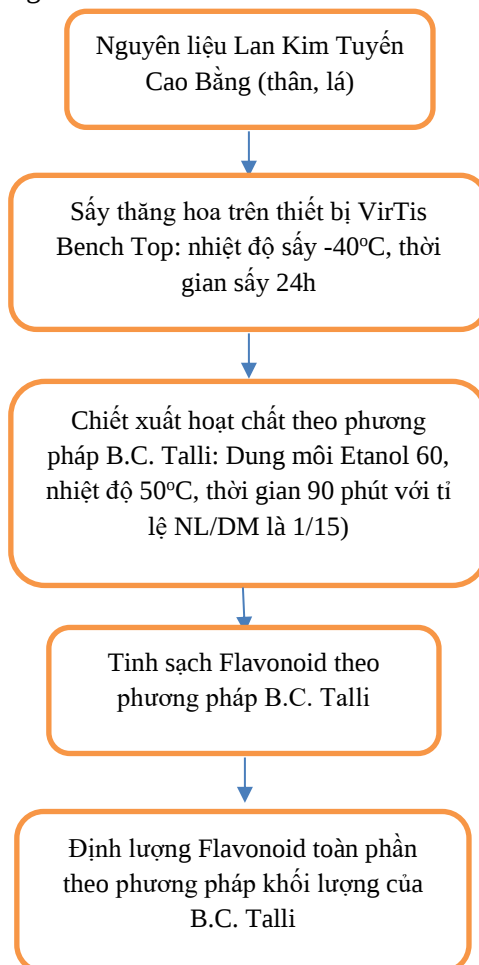
4. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu ảnh hưởng của một số thông số trong quy trình cao phân đoạn Flavonoid từ sinh khối thân lá Lan Kim Tuyền bằng phương pháp sóng siêu âm cho kết luận như sau:

- Các yếu tố (Loại và nồng độ dung môi, nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi) đều ảnh hưởng đến hàm lượng Flavonoid thu được từ 100 g nguyên liệu khô của thân và lá Lan Kim Tuyền.

- Etanol 60% cho hiệu suất trích ly flavonoid cao nhất khi so với chiết trong nước cất hoặc ở các nồng độ 98%.
- Ngưỡng nhiệt độ trích ly thích hợp nhất trong các ngưỡng nhiệt thí nghiệm là 50°C.
- Trong các thời gian trích ly khảo sát, 90 phút trích ly là thích hợp nhất trong chiết cao phân đoạn giàu Flavonoid.
- Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (v/w) thích hợp nhất trong chiết Flavonoid từ thân, lá Lan Kim Tuyến Cao Bằng là 1/15.

Kết quả nghiên cứu có thể khái quát thành quy trình chiết xuất Flavonoid từ sinh khối thân và lá của Lan Kim Tuyến Cao Bằng ở hình 5.



Hình 5. Quy trình chiết xuất Flavonoid từ sinh khối thân và lá của Lan Kim Tuyến Cao Bằng

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Ministry of science and technology, *VietNam red data book (part II. plants)*. Science and Technics Publishing House, Ha Noi, p. 409, 2007.
- [2] C. C. Chan, C. L. Hou, C. H. Chung, and W. T. Liu, "Evaluation of an in vitro virus culturesystem for anti-virus study of the Chinese herb," *J. Food Drug Anal*, vol. 2, no. 2, pp. 123-132, 1994.
- [3] C. N. He, C. L. Wang, S. X. Guo, J. S. Yang, and P. G. Xiao, "A novel flavonoid glucoside from *Anoetochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.," *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 48, no. 3, pp. 359-363, 2006.
- [4] T. G. Do, V. H. Ha, H. H. Chu, and B. N. Pham, "Investigation of some Chemical Characteristics and Antioxidant Effects of Flavonoids Compounds Extracted from the Species of *Anoetochilus* in

- Vietnam,” *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, vol. 33, no. 1S, pp. 104-113, 2007.
- [5] F.-S. Zhang, Y. Zhao, and S.-X. Guo, “Promoting role of an endophyte on the growth and contents of kinsenosides and flavonoids of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a rare and threatened medicinal Orchidaceae plant,” *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, vol. 14, no. 9, pp. 785-792, 2013.
- [6] C.-N. He, C.-L. Wang, S.-X. Guo, J.-S. Yang, P.-G. Xiao, “Study on chemical constituents of *Anoectochilus roxburghii*,” *China Journal of Chinese materia medica*, vol. 30, no. 10, pp. 761-763, 2005.
- [7] J.-M. Lin, C.-C. Lin, H. F. Chiu, J.-J. Yang, and S.-G. Lee, “Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *annoectochilus formosanus*, *ganoderma lucidum* and *gynostemma pentaphyllum* in rats,” *The American journal of Chinese medicine*, vol. 21, no. 01, pp. 59-69, 1993.
- [8] S. Kim, G. A. Wie, Y. A. Cho, H. H. Kang, K. A. Ryu, and M. K. Yoo, “The Role of Red Meat and Flavonoid Consumption on Cancer Prevention,” *The Korean Cancer Screening Examination Cohort. Nutrients*, vol. 9, no. 9, p. 938, 2017.
- [9] D. C. Le, B. T. Bui, T. T. H. Ha, T. K. Ngo, and Q. H. Le, “Quantification of quercetin, isorhamnetin and ferulic acid in dry extract of *Anoectochilus setaceus* Blume from Vietnam,” *International Journal of Botany Studies*, vol. 4, pp. 14-18, 2019.
- [10] Q. Li, F. Q. Ren, C. L. Yang, L. M. Zhou, Y. Y. Liu, J. Xiao, L. Zhu, and Z. G. Wang, “Anti-proliferation effects of isorhamnetin on lung cancer cells in vitro and in vivo,” *Asian Pac J Cancer Prev.*, vol. 16, no. 7, pp. 3035-3042, 2015.
- [11] M. Hamalainen, R. Nieminen, P. Vuorela, M. Heinonen, and E. Moilanen, *Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages*, Mediators of inflammation, 2007.
- [12] O. T. Mak, D. D. Huang, and R. C. S. Law, “*Anoectochilus formosanus* Hay. Contains substances that affect arachidonic acid metabolism,” *Phytotherapy Research*, vol. 4, no. 2, pp. 45-48, 1990.
- [13] P. Budluang, P. Pitchakarn, P. Ting, P. Temviriyankul, A. Wongnoppawich, and A. Imsumran, “Anti inflammatory and anti insulin resistance activities of aqueous extract from *Anoectochilus burmannicus*,” *Food science & nutrition*, vol. 5, no. 3, pp. 486-496, 2007.