

Khảo sát một số đặc điểm hóa học và tác dụng chống oxy hóa (antioxydant) của các hợp chất Flavonoid chiết xuất từ một số loài lan Kim tuyến của Việt Nam

Đỗ Thị Gấm^{1,*}, Hà Việt Hải², Chu Hoàng Hà³, Phạm Bích Ngọc³

¹Trung tâm Phát triển Công nghệ cao, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Công nghệ Sinh học, VAST, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 12 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số từ 3 loài lan Kim tuyến của Việt Nam, kết quả cho thấy hàm lượng Flavonoid tổng số cao nhất ở loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl (1.345%), sau đó đến loài *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downiex (1.044%) và thấp nhất là loài *Anoectochilus aff. anamensis* Aver (0.903%). Hợp chất Flavonoid được tích lũy chủ yếu ở lá cây lan Kim tuyến. Tiến hành sắc ký lớp mỏng chế phẩm Flavonoid tổng số thu từ các loài lan Kim tuyến ở hệ dung môi Ethylaxetat: Toluen: Axit formic: Nước = 7:3:1,5:1 (v:v:v) nhận thấy có từ 9-14 cấu tử được tách ra, các cấu tử tách rõ ràng, riêng biệt và có các đặc điểm định tính đặc trưng của nhóm chất Flavonoid. Hợp chất Flavonoid chiết xuất từ 3 loài lan Kim tuyến đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt thông qua phản ứng oxy hóa indigocarmin bởi enzym peroxydaza trên nhóm máu O. Thứ tự chống oxy hóa của các loài lan Kim tuyến trong nghiên cứu như sau: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl > *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downiex > *Anoectochilus aff. anamensis* Aver.

Từ khóa: Lan Kim tuyến, Flavonoid, hoạt tính chống oxy hóa.

1. Mở đầu

Chi lan Kim tuyến *Anoectochilus*, thuộc họ Lan - *Orchidaceae* có khoảng 40 - 50 loài, được biết đến nhiều không những bởi giá trị làm cảnh, mà bởi giá trị làm thuốc của nó. Theo y học cổ truyền Trung Hoa, lan Kim tuyến được dùng để điều trị đau bụng, viêm thận, sốt, huyết áp cao, liệt dương, điều trị bệnh tiểu đường, làm tan khối u, giảm lipase trong máu, chữa viêm gan,... [5]. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã cho biết thành phần hóa học trong các

loài lan Kim tuyến gồm chủ yếu là các nhóm chất như: các chất béo, Flavonoid, Glycoside, Axit hữu cơ, Polysaccharid, Triterpen và Steroid [1]. Flavonoid là nhóm hợp chất lớn thường gặp trong thực vật, đặc biệt trong các cây dược liệu. Những Flavonoid có hoạt tính sinh học được gọi là Bioflavonoid. Một trong các hoạt tính sinh học nổi trội của Bioflavonoid là tác dụng chống oxy hóa (antioxydant). Tác dụng chống oxy hóa là khả năng tiêu diệt hay còn gọi là khả năng “triệt tiêu” các “gốc tự do” có hại trong cơ thể con người. Đây là tác dụng rất quan trọng trong việc ngăn chặn sự hủy hoại cơ thể do các “gốc tự do” gây ra và ngăn chặn sự phát triển và

*Tác giả liên hệ. ĐT: 84-983963138.

Email: honggamitc@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4559>

phát sinh nhiều loại bệnh hiểm nghèo như bệnh tim mạch, ung thư, thần kinh, lão hóa, ...

Hiện tại ở nước ta có khoảng từ 12-15 loài lan Kim tuyến, được phân bố khá rộng, từ các tỉnh miền núi phía Bắc như Hòa Bình (Mai châu), Sơn La, Lào Cai (Sapa, Văn Bàn), Hà Tĩnh (Hương Sơn) đến các tỉnh miền thuộc Trung và Tây Nguyên như Quảng Trị, Kontum (núi Ngọc Linh, núi Chư Mom Ray), Đắk Lắk (Krông Bông), Lâm Đồng (núi Bidoup) [7]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy các cây dược liệu khi phân bố ở các vùng sinh thái có điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, khí hậu và thành phần môi trường dinh dưỡng khác nhau sẽ có chất lượng khác nhau, cụ thể là thành phần và hàm lượng các hợp chất tự nhiên trong cây khác nhau, từ đó dẫn đến tác dụng sinh dược học cũng khác nhau. Do đó nghiên cứu về thành phần, hàm lượng các chất tự nhiên và đánh giá tác dụng sinh dược học của các loài lan Kim tuyến ở các vùng sinh thái khác nhau là nghiên cứu hết sức cần thiết, có giá trị về mặt khoa học và kinh tế. Để tăng thêm những hiểu biết cơ bản, giúp cho việc định hướng khai thác và sử dụng hiệu quả các loài lan Kim tuyến của Việt Nam vào lĩnh vực y dược,... chúng tôi tiến hành khảo sát một số đặc điểm hóa học và tác dụng chống oxy hóa (antioxydant) của các hợp chất Flavonoid chiết xuất từ một số loài lan Kim tuyến của Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp xử lý mẫu

Xác định trọng lượng khô tuyệt đối của nguyên liệu: Cân chính xác 100g mẫu nguyên liệu, sấy khô kiệt ở 100°C, cân xác định đến khi trọng lượng không đổi (thí nghiệm được lặp lại 5 lần).

Xử lý mẫu: Ngâm mẫu qua đêm, sau đó chiết trên máy siêu âm Power Sonic 410 ở điều kiện nhiệt độ 50°C, thời gian 90 phút (chiết mẫu lặp lại 3 lần). Gộp các dịch chiết lại để làm dịch nghiên cứu.

2.2. Phương pháp định tính [6]

Phản ứng FeCl_3 5%: Nhỏ 50 μl dịch chiết Ethanol 96° của các mẫu lan Kim tuyến vào giấy thấm, sấy khô. Sau đó, nhỏ 2-3 giọt thuốc thử FeCl_3 5% lên và sấy khô. Phản ứng dương tính sẽ cho màu lục, xanh đen, xanh lam và nâu tùy theo nhóm Flavonoid và số lượng, vị trí nhóm OH trong phân tử.

Phản ứng NaOH 10%: Nhỏ 50 μl dịch chiết Ethanol 96° của các mẫu lan Kim tuyến vào giấy thấm, sấy khô. Sau đó, nhỏ 2-3 giọt thuốc thử NaOH 10% lên và sấy khô. Phản ứng tạo ra muối phenolat có màu khác nhau tùy thuộc vào nồng độ Flavonoid và tùy theo nhóm Flavonoid. Nhóm Flavon và Flavonol cho màu vàng sáng, Anthocyanidin cho màu xanh dương, Chalcon và Auron có thể cho màu đỏ da cam.

Phản ứng Diazo: Đây là phản ứng khử đặc hiệu của các Flavonoid có OH ở vị trí 7, nhóm OH ở vị trí này phản ứng với muối diazo để tạo thành chất màu azoic có màu vàng cam đến đỏ cam. Lấy 1ml dịch chiết Ethanol 96° của các mẫu lan Kim tuyến cho vào ống nghiệm, sau đó nhỏ 2-3 giọt thuốc thử Diazo vào, phản ứng dương tính cho màu vàng cam đến đỏ cam.

Phản ứng Shinoda (phản ứng Cyanidin): Phản ứng do sự có mặt nhân γ -penzopyron trong đa số Flavonoid. Lấy 1 ml dịch chiết Ethanol 96° của các mẫu lan Kim tuyến cho vào ống nghiệm, sau đó cho vào mỗi ống nghiệm 1 viên kẽm và 2-3 giọt dung dịch HCl đặc. Đun cách thủy đến khi dung dịch phản ứng sôi. Phản ứng dương tính cho màu đỏ cam hay đỏ thẫm.

2.3. Chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số theo phương pháp của B.C. Talli [2, 4]

a. Qui trình chiết (B.C. Talli)

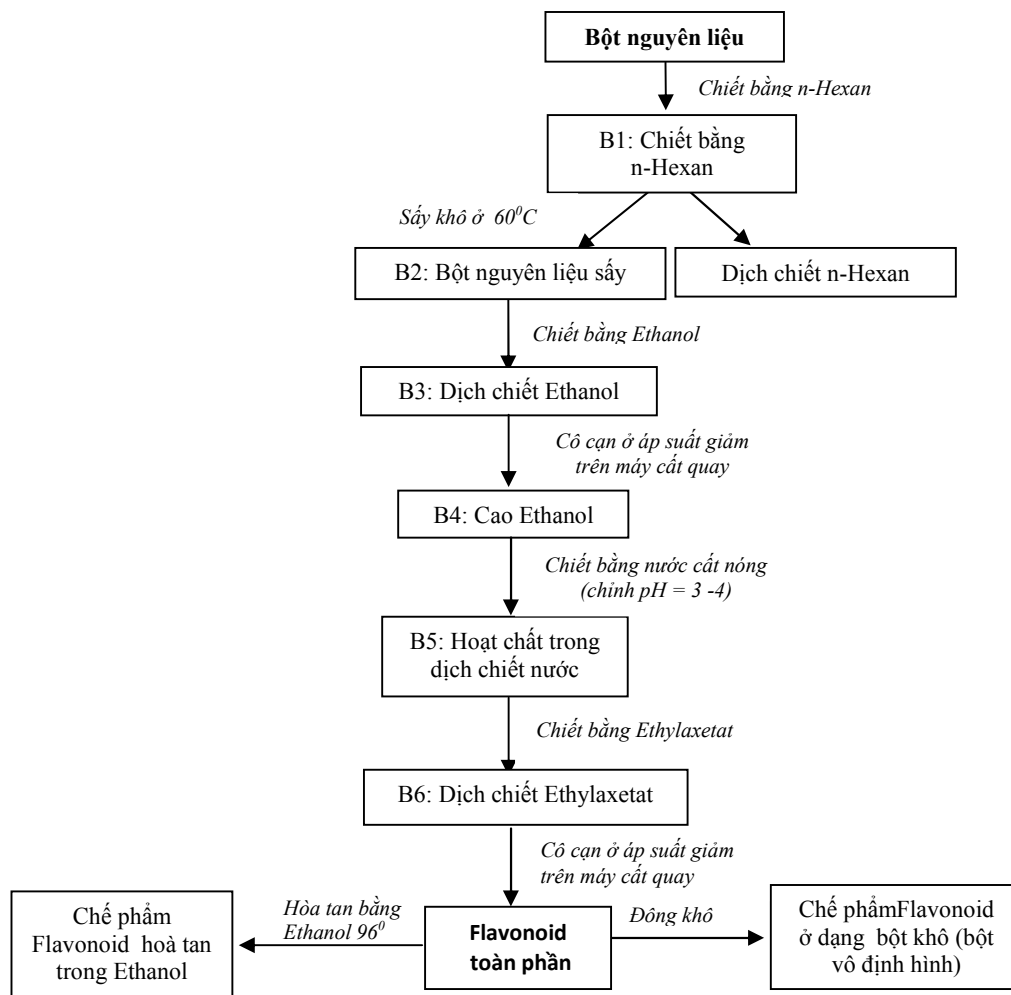
Tách chiết Flavonoid theo qui trình của B.C. Talli [2, 4], các bước trong qui trình được mô tả chi tiết dưới đây (Hình 1).

b. Định lượng Flavonoid tổng số

Cân 10g bột nguyên liệu, chiết bằng n-Hexan trên máy siêu âm trong 3 giờ để loại

nhựa, chất béo, carotenoid... Bộ phận dịch chiết n-Hexan, thu phần bã nguyên liệu, sấy khô và chiết bằng Ethanol 96° (hoặc Ethanol 60° hoặc

nước) trên máy siêu âm đến khi dịch chiết không còn phản ứng Shinoda. Xác định thể tích dịch chiết Ethanol 96°.



Hình 1. Qui trình B.C. Talli.

Lấy 100 ml dịch chiết Ethanol 96°, cô cạn ở điều kiện áp suất giảm trên máy cất quay chân không. Thu cặn chiết Ethanol, hòa tan bằng nước cất nóng, lọc thu dịch chiết nước và chỉnh pH = 3-4. Dùng Ethylacetat chiết nhiều lần, thu dịch chiết Ethylacetat đem cô cạn trên máy cất quay chân không, cặn thu được là Flavonoid tổng số. Cân xác định trọng lượng, hàm lượng Flavonoid chứa trong mẫu phân tích được tính theo công thức:

$$X \% = [(M_2 - M_1) \times V/v \times 10] / 100$$

Trong đó: V: thể tích dịch chiết Ethanol từ 10g bột nguyên liệu; v: thể tích dịch chiết Ethanol dùng định lượng (100 ml); M₂: trọng lượng khi cân cặn Flavonoid cả bì; M₁: trọng lượng bì.

2.4. Phân tích thành phần Flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng [4, 6]

Dùng bản mỏng Silicagel F 254 để chạy sắc ký một chiều các chế phẩm Flavonoid với các hệ dung môi triển khai khác nhau. Quan sát sắc

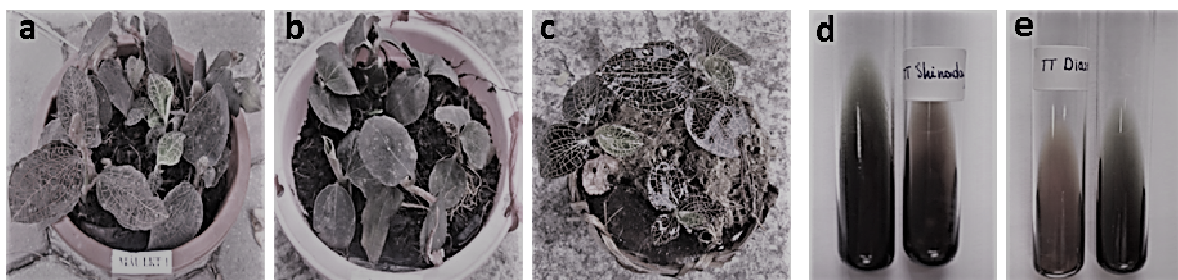
ký đồ ở điều kiện: ánh sáng tự nhiên, phun các thuốc thử đặc hiệu ($FeCl_3$, $AlCl_3$, Willson, Diazo), dưới đèn tử ngoại (UV-254 và UV-365 nm).

2.5. Xác định hoạt độ peroxydaza trong máu

Máu tươi được chống đông bằng EDTA (do khoa huyết học Bệnh viện giao thông vận tải Hà Nội cung cấp) được pha loãng 500 lần bằng dung dịch NaCl 0,9%. Thí nghiệm được tiến hành trên nhóm máu O của người khỏe mạnh. Hoạt độ peroxydaza trong máu được xác định theo phương pháp của E.C. Xavron [2, 3]. Phản ứng gồm: 60 μ l đệm axetat natri pH 4,7 nồng độ 0,1N+ 60 μ l máu đã pha loãng 500 lần+ 60 μ l H_2O_2 0,2N+ 20 μ l Indigocarmin 0,001N + chất thử là các chế phẩm Flavonoid chiết xuất từ các mẫu lan kim Tuyến khác nhau. Để thời gian phản ứng 20 phút, sau đó đọc kết quả ở bước sóng 610nm, trên máy quang phổ UV/VIS Camspex M108.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số trong cây lan Kim tuyến



Hình 2. Hình ảnh của 3 loài lan Kim tuyến nghiên cứu và kết quả định tính nhóm chất Flavonoid.

a, b, c: LKT1, LKT2, LKT3

d, e: kết quả phản ứng Shinoda của mẫu LKT3, kết quả phản ứng Diazo của mẫu LKT3.

Dùng dịch chiết Etanol 96° của 3 mẫu cây lan Kim tuyến để tiến hành kiểm tra các phản ứng định tính đặc trưng ($NaOH$ 10%, $FeCl$ 5%, Shinoda, Diazo) phát hiện nhóm chất Flavonoid, kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

3.1.1. Định tính nhóm chất Flavonoid trong các mẫu lan Kim tuyến bằng các phản ứng đặc trưng

Tiến hành thu hái 8 mẫu lan Kim tuyến từ Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà - tỉnh Lâm Đồng, Vườn thực nghiệm Kon Plong - tỉnh Kon Tum và tại huyện Mai Châu - tỉnh Hòa Bình, tất các mẫu đều được giám định tên khoa học tại phòng Thực vật của Viện sinh thái và tài nguyên sinh vật. Dựa vào đặc điểm hình thái của thân, rễ, lá và hoa của các mẫu thu được kết hợp với việc tra cứu, so sánh với các loài lan Kim tuyến đã được công bố trong “Sách đỏ Việt Nam, phần II. Thực Vật” và các loài lan Kim tuyến trong “Cây cỏ Việt Nam” của GS. Phạm Hoàng Hộ. Đồng thời phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu nghiên cứu thông qua việc phân tích các chỉ thị barcode như matK, psbA-trnH và ITS. Đã xác định được 3 loài lan Kim tuyến khác nhau từ 8 mẫu thu hái, cụ thể là các loài: *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downie (LKT1, thu từ Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà), *Anoectochilus aff. anamensis* Aver (LKT2, thu từ Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà), *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl (LKT3, thu từ Vườn thực nghiệm Kon Plong).

Các kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy: dịch chiết Ethanol 96° của các mẫu nghiên cứu đều cho phản ứng dương tính với các thuốc thử đặc hiệu của nhóm chất Flavonoid, chứng tỏ trong các cây lan Kim tuyến nghiên cứu đều có nhóm chất Flavonoid.

Bảng 1. Kết quả định tính nhóm chất Flavonoid trong các mẫu lan Kim tuyến

STT	Tên mẫu	NaOH 10%	FeCl ₃ 5%	Shinoda	Diazo
1	LKT1	Vàng nhạt 2+	Xanh đen 2+	Đỏ nâu 3+	Vàng cam 3+
2	LKT2	Vàng nhạt 1+	Xanh đen 2+	Đỏ nâu 2+	Vàng cam 2+
3	LKT3	Vàng nhạt 2+	Xanh đen 2+	Đỏ nâu 4+	Vàng cam 3+

Ghi chú: (Dấu +: chỉ phản ứng dương tính; các con số: chỉ mức độ đậm nhạt của màu phản ứng)

Phản ứng FeCl₃ có màu xanh đen đặc trưng đã cho thấy sự có mặt của những Flavonoid có cấu tạo orthodiphenol. Phản ứng Shinoda có màu nâu đỏ và phản ứng Diazo có màu vàng cam điển hình đã chỉ ra sự có mặt các chất Flavonoid mang nhóm cacbonyl (>C = O) ở vị trí C₄ và đây là một trong những đặc điểm cấu tạo hoá học quan trọng cần có đối với một Bioflavonoid.

3.1.2. Ảnh hưởng của dung môi chiết xuất đến hàm lượng Flavonoid tổng số trong cây lan Kim tuyến

Dung môi chiết là một trong những yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất các hợp chất tự nhiên trong thực vật. Cả hiệu quả chiết xuất và hoạt tính của các chất chiết xuất phụ thuộc rất lớn vào dung môi và

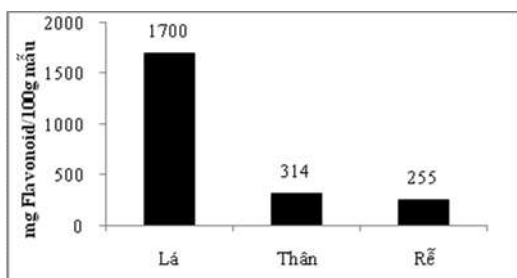
nồng độ dung môi chiết [8]. Để lựa chọn dung môi chiết xuất, người ta thường dựa vào mục đích chiết xuất, khả năng phân cực của nhóm chất cần chiết xuất, độ phân cực của các thành phần không mong muốn, tổng chi phí, các vấn đề về an toàn và môi trường [9]. Ethanol là dung môi thường được sử dụng rộng rãi để chiết xuất nhóm chất Flavonoid từ nguyên liệu thực vật bởi lẽ nhiều hợp chất Flavonoid tan tốt trong dung môi này và so với các dung môi khác thì ít độc hơn và chi phí cũng rẻ nhất [4, 6]. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành chiết xuất và định lượng Flavonoid tổng số từ các mẫu lan Kim tuyến thu được theo qui trình B.C. Talli ở các điều kiện dung môi (trong giai đoạn B3 của qui trình) khác nhau như: Ethanol 96°, Ethanol 60° và nước.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dung môi chiết xuất đến hàm lượng Flavonoid tổng số trong cây lan Kim tuyến

TT	Mẫu nghiên cứu	Trọng lượng khô tuyệt đối (%)	Hàm lượng Flavonoid tổng số (mg Flavonoid/100g mẫu khô, n=5)		
			Chiết bằng Etanol 96°	Chiết bằng Etanol 60°	Chiết bằng nước
1	LKT1	16,34	979,4 ± 3,61	1.044 ± 8,22	788 ± 4,81
2	LKT2	16,41	832,2 ± 11,3	903,2 ± 8,63	677,6 ± 6,08
3	LKT3	16,65	1.207,6 ± 12,4	1.345 ± 9,20	969,4 ± 8,92

Các kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy: cả 3 ba mẫu lan Kim tuyến đều có % trọng lượng khô tuyệt đối tương đương nhau; tất cả các mẫu khi sử dụng dung môi chiết là Ethanol 60° đều cho hàm lượng Flavonoid cao hơn đáng kể so với dung môi chiết là Ethanol 96° và nước (P<0,05); và dù chiết xuất bằng loại dung môi nào thì loài *A. roxburghii* (Wall.) Lindl (LKT3) luôn có hàm lượng Flavonoid tổng số cao nhất, sau đó đến loài *A. lylei* Rolfe ex Downiex

(LKT1), thấp nhất là loài *A. aff.anamensis* Aver (LKT2). Cụ thể, khi chiết bằng Ethanol 60° hàm lượng Flavonoid tổng số thu được từ 100g mẫu khô LKT3, LKT1, LKT2 tương ứng là: 1.345± 9,20 mg; 1.044±8,22 mg; 903,2±8,63 mg (tương đương với 1,345%; 1,044% và 0.903%). Như vậy có thể lựa chọn Ethanol 60° làm dung môi để chiết xuất nhóm hợp chất Flavonoid từ cây lan Kim tuyến (dung môi chiết ở giai đoạn B3 trong qui trình B.C. Talli).



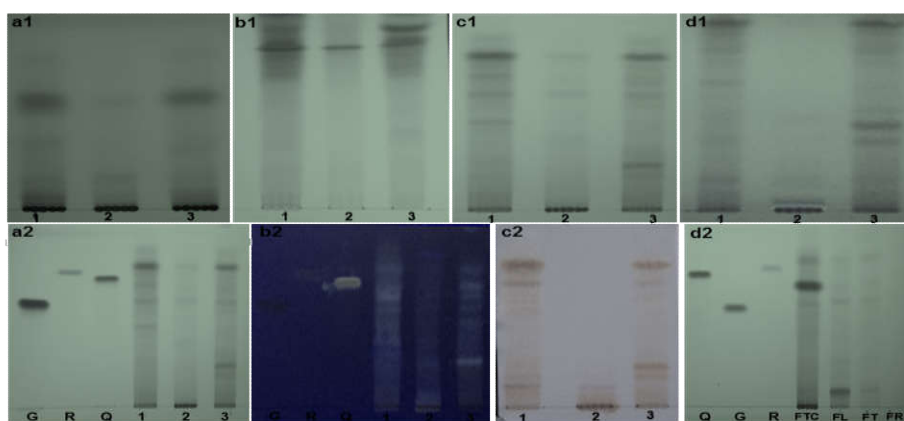
Hình 3. Hàm lượng Flavonoid tổng số ở các bộ phận khác nhau của cây lan Kim Tuyền.

Hình 3 trình bày kết quả định lượng Flavonoid tổng số của các bộ phận: lá, thân và rễ cây LKT3. Kết quả cho thấy phần lá cây lan Kim Tuyền có chứa nhiều Flavonoid nhất, với hàm lượng là $1.700 \pm 12,54$ mg/100g mẫu khô, tiếp theo là phần thân và rễ với hàm lượng Flavonoid tương ứng là $314 \pm 9,87$ mg/100g mẫu

khô và $255 \pm 9,23$ mg/100g mẫu khô. Như vậy, ở cây lan Kim Tuyền thì lá là bộ phận giàu hợp chất Flavonoid nhất, hàm lượng Flavonoid ở lá cao gấp 5,4 lần thân và 6,67 lần rễ.

3.2. Khảo sát thành phần Flavonoid tổng số thu được bằng sắc ký lớp mỏng

Việc phân tích thành phần Flavonoid tổng số bằng sắc ký lớp mỏng, được tiến hành đồng thời trên cả 3 chế phẩm Flavonoid thu được từ 3 mẫu cây lan Kim Tuyền LKT1, LKT2, LKT3; các chế phẩm Flavonoid này được ký hiệu tương ứng là F-LKT1, F-LKT2 và F-LKT3. Các chế phẩm nghiên cứu đều có hàm lượng là 0.05g/1ml và lượng mẫu đưa lên bản mỏng cũng bằng nhau đều là 5 μ l.



Hình 4. Sắc ký đồ Flavonoid của các mẫu lan Kim Tuyền.

(Ghi chú: 1, 2, 3: F-LKT1, F-LKT2, F-LKT3; G: axit Gallic; R: Resveratrol; Q: Quercetin; FTC: Flavonoid toàn cây; FL: Flavonoid từ lá; FT: Flavonoid từ thân; FR: Flavonoid từ rễ. a1, b1, c1, d1: Sắc ký đồ của F-LKT1, F-LKT2, F-LKT3 khi triển khai bằng Hệ 1, Hệ 2, Hệ 3, Hệ 4. a2, b2, c2: Sắc ký đồ của F-LKT1, F-LKT2, F-LKT3 quan sát ở UV-254, Willson, Diazo; d2: sắc ký đồ của các chế phẩm FTC, FL, FT, FR)

Để tìm hệ dung môi sắc ký phù hợp cho các chế phẩm trên, chúng tôi tiến hành khảo sát sắc ký một chiều ở 4 hệ dung môi sau: Hệ 1 = n-Hexan: Ethylaxetat: Axit formic = 6: 3: 0,1 (v:v:v), Hệ 2 = Ethylaxetat: Metanol: Nước = 10: 2: 1 (v:v:v:v); Hệ 3 = Toluene: Ethylaxetat: Aceton : Axit formic = 5: 2: 2: 1 (v:v:v:v); Hệ 4 = Ethylaxetat: Toluene: Axit formic: Nước = 7: 3: 1,5: 1 (v:v:v:v).

Các sắc ký đồ hình a1, b1, c1, d1 cho thấy: khi triển khai sắc ký ở hệ dung môi 1 (Hệ 1), các chế phẩm Flavonoid chiết xuất từ các mẫu lan kim Tuyền tách được 6 cấu tử, các cấu tử tách rõ ràng và riêng biệt. Tại hệ dung môi 2 (Hệ 2), thấy tách được 10 cấu tử, nhưng các cấu tử có $R_f > 0,5$ tách không rõ ràng, gần sát vào nhau.

Bảng 3. Đặc điểm sắc ký lớp mỏng của hợp chất Flavonoid chiết xuất từ các mẫu lan Kim tuyến khi triển khai bằng Hệ 4 và quan sát ở các điều kiện khác nhau

Rf	F-LKT1					F-LKT2					F-LKT3				
	ASTN	UV-254	FeCl ₃	Diazo	Willson	ASTN	UV-254	FeCl ₃	Diazo	Willson	ASTN	UV-254	FeCl ₃	Diazo	Willson
C/T 1: 0.08	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 4+	Vàng 2+	-	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen 2+	Vàng +	-	Vàng 2+	Đen xám 2+	Xanh đen 4+	Vàng 2+	-
C/T2: 0.12	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 2+	Hòn g tím 4+	-	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen +	Hòn g tím 2+	-	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 2+	Hòn g tím 2+	-
C/T 3: 0.20	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 4+	Vàng cam 3+	-	-	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng cam +	-	Vàng 2+	Đen xám 3+	Xanh đen 4+	Vàng cam 3+	-
C/T 4: 0.31	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 4+	Vàng cam 2+	P/q tím lơ	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng cam +	P/q tím lơ	Vàng 3+	Đen xám 4+	Xanh đen 4+	Vàng cam 4+	P/q tím lơ
C/T 5: 0.38	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 2+	Vàng cam +	P/q tím lơ	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 2+	Vàng cam +	-	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen 2+	Vàng cam +	P/q tím lơ
C/T 6: 0.42	-	-	-	-	P/q VX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P/q VX
C/T 7: 0.46	Vàng 2+	Đen xám 3+	Xanh đen +	Vàng +	-	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng +	-	Vàng 2+	Đen xám 3+	Xanh đen +	Vàng +	-
C/T 8: 0.52	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng +	-	-	Đen xám +	-	-	-	Vàng +	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng +	-
Vết 9: 0.57	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen +	Vàng +	-	-	Đen xám +	Xanh đen +	Vàng +	-	Vàng +	Đen xám 2+	Xanh đen +	Vàng +	-
C/T 10: 0.61	-	Đen xám 2+	Xanh đen +	Vàng +	-	-	-	-	-	-	-	Đen xám 2+	Xanh đen +	Vàng +	-
C/T 11: 0.67	Vàng 2+	Đen xám 3+	Xanh đen 2+	Vàng nâu 3+	P/q VX	Vàng +	-	-	-	-	Vàng 2+	Đen xám 3+	Xanh đen 2+	Vàng nâu 3+	P/q VX
C/T 12: 0.70	-	-	-	-	P/q VX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P/q VX
C/T 13: 0.73	Vàng đậm 4+	Đen xám 4+	Nâu 3+	Vàng cam 4+	P/q tím lơ	Vàng đậm 2+	Đen xám 2+	Nâu 3+	Vàng cam +	P/q tím lơ	Vàng đậm 4+	Đen xám 4+	Nâu 3+	Vàng cam 4+	P/q tím lơ
C/T 14: 0.83	Vàng nâu 2+	Đen xám 2+	Vàng nâu 3+	Vàng 2+	-	Vàng nâu +	-	-	-	-	Vàng nâu 2+	Đen xám 2+	Vàng nâu 3+	Vàng 2+	-

Ghi chú:

Dấu +: chỉ phản ứng dương tính; Dấu -: chỉ phản ứng âm tính; các con số: chỉ mức độ đậm nhạt của màu phản ứng; P/q VX: phát quang màu vàng xanh; C/T: cấu tử.

Tại hệ dung môi 3 (Hệ 3) và 4 (Hệ 4), thấy tách được 12 cấu tử khi quan sát ở ánh sáng tự nhiên (ASTN), các cấu tử tách rõ ràng, gọn và riêng biệt. Tại Hệ 4, nhận thấy các cấu tử có Rf < 0.4 tách rất rõ và có khoảng cách xa nhau hơn

so với Hệ 3. Như vậy có thể chọn hệ dung môi 4 để triển khai sắc ký bản mỏng cho các hợp chất Flavonoid chiết xuất từ cây lan Kim tuyến.

Trên ảnh sắc ký đồ (ảnh a2, b2, c2) và kết quả ở Bảng 3 cho thấy: sắc ký đồ của chế phẩm

F-LKT1 và F-LKT3 hoàn toàn giống nhau, khi quan sát ở UV-254 và UV-365 nhận đều xuất hiện 14 cấu tử, ứng với giá trị $R_f = 0.08; 0.12; 0.20; 0.31; 0.38; 0.42; 0.46; 0.52; 0.57; 0.61; 0.67; 0.70; 0.73; 0.83$. Trong đó, cấu tử số 6 ($R_f=0.42$) và cấu tử 12 ($R_f=0.7$) không thấy xuất hiện ở ánh sáng tự nhiên (ASTN) và UV-254, nhưng lại phát quang vàng xanh ở UV=365; các cấu tử còn lại đều có màu đen xám khi soi dưới UV-254 nm. Các cấu tử 2, 3, 4 tách ra trên sắc ký đồ của chế phẩm F-LKT3 rõ hơn và có màu đậm hơn so với chế phẩm F-LKT1. Tất cả cấu tử tách ra trên sắc ký đồ đều có phản ứng dương tính khi phun thuốc thử $FeCl_3$, Diazo và Willson đã chứng tỏ đó đều là những hợp chất Flavonoid. Sắc ký đồ của chế phẩm F-LKT2 luôn xuất hiện mờ và có màu nhạt hơn so với chế phẩm F-LKT1 và F-LKT3, và chỉ có 9 cấu tử xuất hiện, có 5 cấu tử không thấy xuất hiện trên sắc ký đồ như: cấu tử số 6 ($R_f=0.42$), cấu tử số 8 ($R_f=0.61$), cấu tử 11 ($R_f=0.67$), cấu tử 12 ($R_f=0.70$) và cấu tử số 14 ($R_f=0.83$), điều này cũng đã lý giải được là do mẫu LKT2 luôn có hàm lượng Flavonoid tổng số thấp hơn mẫu LKT1 và LKT3. Kết quả ở ảnh d2, cũng cho biết sắc ký đồ của chế phẩm Flavonoid chiết xuất từ lá và thân cây lan Kim tuyến là như nhau và các cấu tử tách ra luôn rõ hơn so với chế phẩm Flavonoid chiết xuất từ rễ cây lan Kim tuyến.

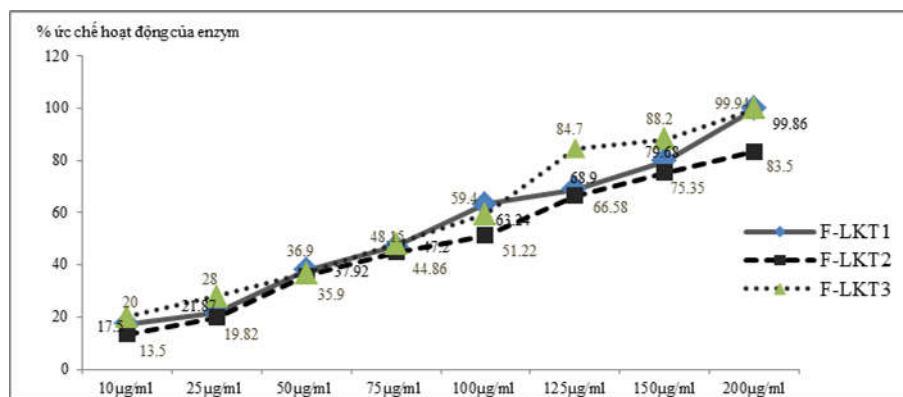
3.3. Khảo sát tác dụng chống oxy hoá của chế phẩm Flavonoid thu từ các loài lan Kim tuyến

Việc bổ sung cho cơ thể các chất “*triệt tiêu*” các gốc tự do (gọi là các chất chống oxy hóa - antioxydant) là biện pháp lý tưởng trong việc phòng chống nhiều loại bệnh tật. Các chất chống oxy hóa có nguồn gốc tự nhiên thường được nói đến là: β -caroten, Vitamin E, Vitamin C, Selen, Flavonoid... Hiện nay nhiều nghiên cứu đã cho biết Flavonoid là chất chống oxy hóa hữu hiệu đối với con người. Một số Flavonoid có ái lực cao đối với enzym peroxydase tham gia vào phản ứng enzym với vai trò là một cơ chất và bị oxy hoá từ dạng khử (*hydroquinon*) thành dạng *semiquinon* hoặc

quinon. *Quinon* và *semiquinon* sinh ra từ những Flavonoid tương ứng là những gốc tự do bền, có khả năng “*triệt tiêu*” các gốc tự do hoạt động có hại của cơ thể. Trong phản ứng oxy hoá Indigocarmin hoạt độ enzym càng giảm thì số lượng *semiquinon* hoặc *quinon* được tạo thành càng nhiều và điều đó thể hiện khả năng chống oxy hoá của Flavonoid. Trong phản ứng này Flavonoid đóng vai trò là cơ chất cạnh tranh với Indigocarmin. Dựa vào việc xác định cường độ màu của phản ứng oxy hoá cơ chất Indigocarmin bởi H_2O_2 trong môi trường axit yếu khi có sự tham gia của enzym peroxydaza ở bước sóng 610nm có thể tính được hoạt tính enzym (từ đó sẽ tính được % ức chế hoạt động của enzym). Hoạt tính enzym peroxydaza ở mẫu đối chứng (không có mẫu thử) là 100%, khi có chất thử hoạt tính enzym sẽ thay đổi.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi bước đầu đánh giá hoạt tính chống oxy hoá của các chế phẩm F-LKT1, F-LKT2 và F-LKT3 với các nồng độ thay đổi từ 10 μ g/ml-200 μ g/ml trên nhóm máu O của người - là nhóm máu chiếm tỷ lệ cao trong cộng đồng người Việt Nam. Tác dụng chống oxy hóa của các chế phẩm thể hiện thông qua % ức chế hoạt động của enzym peroxydaza (*% ức chế hoạt động của enzym càng cao thì hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử càng mạnh và ngược lại*).

Các kết quả thu được ở hình 5 cho thấy, từ nồng độ 50 μ g/ml trở lên các chế phẩm có tác dụng làm hoạt độ enzym giảm mạnh và chế phẩm F-LKT3 có tác dụng ức chế hoạt động của enzym tốt nhất thể hiện tại nồng độ 150 μ g/ml đã ức chế 88,2 \pm 2,34% hoạt động của enzym; chế phẩm F-LKT1 ức chế 79,68 \pm 1,74% hoạt động của enzym và chế phẩm F-LKT2 ức chế 75,35 \pm 3,12% hoạt động của enzym. Còn tại nồng độ 200 μ g/ml, chế phẩm F-LKT1 và F-LKT3 đã gần như kìm hãm hoàn toàn hoạt động của enzym (% ức chế hoạt động enzym \geq 99,86%), trong khi chế phẩm F-LKT2 có % ức chế hoạt động enzym là 83,5 \pm 3,06%. Như vậy, chế phẩm F-LKT3 có tác dụng chống oxy hóa tốt nhất và thứ tự chống oxy hóa của các chế phẩm như sau: F-LKT3 > F-LKT1 > F-LKT2.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ Flavonoid chiết xuất từ các mẫu lan Kim Tuyến lên % ức chế hoạt động của enzym Peroxydaza.

4. Kết luận

Trong dịch chiết Ethanol của các mẫu lan Kim tuyến nghiên cứu đều có chứa hợp chất Flavonoid. Ethanol 60° là dung môi phù hợp (sử dụng ở giai đoạn B3 trong quy trình B.C. Talli) để chiết xuất nhóm hợp chất Flavonoid từ cây lan Kim tuyến. Loài *A. roxburghii* (Wall.) Lindl có hàm lượng Flavonoid tổng số cao nhất (1.345%), sau đó là loài *A. lylei* Rolfe ex Downiex (1.044%) và thấp nhất là loài *A. aff. anamensis* Aver (0.903%). Hợp chất Flavonoid được tích lũy chủ yếu là ở lá, lá cây Lan kim tuyến có hàm lượng Flavonoid cao gấp 5,4 lần thân và 6,67 lần rễ.

Chế phẩm Flavonoid tổng số của cây lan Kim tuyến tách được 14 cấu tử khi triển khai sắc ký bản mỏng bằng hệ dung môi Ethylaxetat: Toluene: Axit formic: Nước = 7: 3: 1,5: 1 (v:v:v). Các cấu tử tách ra đều có màu sắc và đặc điểm định tính đặc trưng của các chất Flavonoid.

Các chế phẩm Flavonoid chiết xuất từ 3 loài lan Kim tuyến đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt thông qua phản ứng oxy hóa indigocarmin bởi enzym peroxydaza trên nhóm máu O. Thứ tự chống oxy hóa của các loài lan Kim tuyến nghiên cứu như sau: *A. roxburghii* (Wall.) Lindl > *A. lylei* Rolfe ex Downiex > *A. aff. anamensis* Aver.

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy trong số các loài lan Kim tuyến của Việt Nam thì loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl là loài có giá trị nhất, vì vậy cần

tiếp tục thực hiện các nghiên cứu theo hướng bảo tồn và phát triển để có thể khai thác loài lan này làm dược liệu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Chun-Nian He, Chun-Lan Wang, Shun-Xing Guo, Jun-Shan Yang and Pei-Gen Xiao, A novel flavonoid glucoside from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, J Integrat Plant Biol 48 3 (2006) 359-363.
- [2] Đào Kim Nhung, Đỗ Thị Gắm, Trần Quỳnh Hoa, Trần Nam Thái, Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của Flavonoid chiết xuất từ lá vải (*Litchi chinensis* Sonn) và lá nhãn (*Dimocarpus longan* Lour), Tạp chí Dược học, 394 (2009) 39-43.
- [3] Epmakov A.U. u gp, Phytochemical method, Leningrat Publishing House, 1972
- [4] Gressman, The chemistry of flavonoid compounds, Academic press, Lon don, 1975.
- [5] Lin W. C, Study of health keeping effects of *anoectochilus formosanus* Hayata, Agriculture World, Vol 288 (2007) 8-13.
- [6] Ngô Văn Thu, Bài giảng Dược liệu - Tập 1, Bộ Môn Dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội, 1998.
- [7] Nguyễn Tiến Bản, Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập III, NXB Nông nghiệp Hà Nội, 2005.
- [8] Tan M.C., Tan C.P. and Ho C.W., Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems, International Food Research Journal 20 6 (2013) 3117-3123.
- [9] Wang J., Sun B.G., Cao Y., Tian Y. and Li X. H., Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran, Food Chemistry 106 (2008) 804-810.

Investigation of some Chemical Characteristics and Antioxidant Effects of Flavonoids Compounds Extracted from the Species of *Anoectochilus* in Vietnam

Do Thi Gam¹, Ha Viet Hai², Chu Hoang Ha³, Pham Bich Ngoc³

¹Center for High Technology Development, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam

²Institute of Natural Products Chemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam

³Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam

Abstract: There are flavonoids compositions with high content in *Anoectochilus*: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl: 1.345% (dry weight); *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downiex: 1.044% (dry weight); *Anoectochilus anamensis* Aver: 0.903% (dry weight). There are 9-14 flavonoids from *A. roxburghii*, *A. lylei* and *A. anamensis* in preliminary analysis the total flavonoids samples by solvent system Ethylacetate: Toluene: Formic acid: H₂O = 7: 3: 1,5: 1 (v:v:v:v). All three extracted flavonoids from *A. roxburghii*, *A. lylei* and *A. aff. Anamensis* showed anti - oxidative activity (HTCO) through improving response to indigocarmin reaction by enzyme peroxydase in human blood groups O. The inhibitive rate shown as following order: *A. roxburghii* (Wall.) Lindl > *A. lylei* Rolfe ex Downiex > *A. aff. anamensis* Aver.

Keywords: *Anoectochilus*, Flavonoid, Antioxydant.