**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**

1 *Trung tâm Phát triển công nghệ cao, VAST, số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội*

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

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

**Tóm tắt:** Chiết xuất vàđịnh 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: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, các Flavonoid, các Glycoside 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 phát sinh nhiều loại bệnh hiểm nghèo như bệnh tim mạch, ung thư, thần kinh, lão hóa....

Hiện tại, ở nước ta 12-15 loài lan Kim tuyến đã được thống kê, 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 lớn 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 học,... 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 nghiêncứ**u

***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 100oC, 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 50oC, 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 FeCl3 5%: Nhỏ 50µl dịch chiết Ethanol 96o của các mẫu lan Kim tuyến vào giấy thấm, sấy khô. Sau đó, nhỏ 2-3 giọt thuốc thử FeCl3 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 50µl dịch chiết Ethanol 96o 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. 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 có thể phản ứng với muối diazo để tạo thành chất màu azoic có màu vàng cam đến đỏ cam. Lấy 1ml dịch chiết Ethanol 96o của các mẫu lan Kim tuyến cho vào ống nghiệm, sau đó cho vào 2-3 giọt thuốc thử Diazo, phản ứng dương tính cho màu 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 96o của các mẫu lan Kim tuyến cho vào ống nghiệm, sau đó cho vào mỗi ống nghiệm 1 viên kẽm và bổ sung 2-3 giọt dung dịch HCl đặc. Sau đó, 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).

Dịch chiết n-Hexan

B3: Dịch chiết Ethanol

*Cô cạn ở áp suất giảm trên máy cất quay*

B4**: Cao Ethanol**

Chế phẩm Flavonoid ở dạng bột khô (bột vô định hình)

*Đông khô*

B5: Hoạt chất trong dịch chiết nước

*Hòa tan bằng Ethanol 960*

Chế phẩm Flavonoid hoà tan trong Ethanol

B6: Dịch chiết Ethylaxetat

**Flavonoid**

**toàn phần**

*Chiết bằng nước cất nóng*

*(chỉnh pH = 3 - 4)*

*Chiết bằng Ethylaxetat*

*Cô cạn ở áp suất giảm trên máy cất quay*

*Chiết bằng Ethanol*

B1: Chiết bằng n-Hexan

(loại tạp)

**Bột nguyên liệu**

B2: Bột nguyên liệu sấy khô

*Sấy khô ở 600C*

*Chiết bằng n-Hexan*

Hình 1: Qui trình B.C. Talli

b. Định lượng Flavonoid tổng số

Cân 10 g bột nguyên liệu, chiết bằng n-Hexan trên máy siêu âm trong 3 giờ để loại nhựa, chất béo, caroten... Bỏ phần dịch chiết n-Hexan, thu phần bã nguyên liệu, sấy khô và chiết bằng Ethanol 96o (hoặc Ethanol 60o hoặc nước) trên máy siêu âm đến khi dịch chiết không còn phản ứng Shinoda. Xác định thể tích dịch chiết Ethanol 96o. Lấy 100 ml dịch chiết Ethanol 96o, 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 Ethylaxetat chiết nhiều lần, thu dịch chiết Ethylaxetat 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 % = [(M2 – M1) x V/v x 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 (*FeCl3, AlCl3, 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 E.C. Xavron [2,3]. Phản ứng gồm: 60 μl đệm axetat natri pH 4,7 nồng độ 0,1N + 60 μl máu đã pha loãng 500 lần + 60 μl H2O2 0,2N+ 20 μl 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 610 nm, trên máy quang phổ UV/VIS Camspec M108.

**3. Kết quả và thảo luận**

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

*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, 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*,* vàITS. 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 Downiex(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)*.*

|  |
| --- |
| C:\Users\gam03\Pictures\Họi nghị 1.1.png |

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 96o 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.

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

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| STT | Tên mẫu | NaOH 10% | | FeCl35% | 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)*

Các kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy: dịch chiết Ethanol 96o của cả 3 loài lan Kim tuyến đều cho phản ứng dương tính với các thuốc thử đặc hiệu của nhóm chất Flavonoid, chứng tỏ trong các loài cây này đều có Flavonoid. Phản ứng FeCl3 cho 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 = 0) ở vị trí C4 và đây là một trong những đặc điểm cấu tạo hoá học quan trọng cần có đối với một BioFlavonoid (các chất Flavonoid có hoạt tính sinh học).

*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 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 không mong muốn, tổng chi phí, an toàn và vấn đề 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 nhất và chi phí cũng rẻ nhất [4,6]. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng 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 96o, Ethanol 60o 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/100 g mẫu khô, n=5) | | |
| Chiết bằng  Etanol 96o | Chiết bằng  Etanol 60o | 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 60o đều cho hàm lượng Flavonoid cao hơn đáng kể so với dung môi chiết là Ethanol 96o và nước (P<0,05); Và dù chiết xuất bằng loại dung môi nào thì loài *A. roxburghii* (Wall.) Lindl (LKT3) cũng luôn có hàm lượng Flavonoid cao nhất, sau đó đến loài *A. lylei* Rolfe ex Downiex (LKT1), còn loài *A. aff. anamensis* Aver (LKT2) có hàm lượng thấp nhất. Cụ thể, khi chiết bằng dung môi Ethanol 60o, hàm lượng Flavonoid tổng số thu được từ 100 g 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 60o 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 Tuyến. | 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 lan Kim tuyến có chứa nhiều Flavonoid nhất, với hàm lượng là 1.700±12,54 mg/100g mẫu khô, tiếp theo là phần thân và rễ với hàm lượng Flavonoid tương ứng là 314±9,87mg/100g mẫu khô và 255±9,23 mg/100g mẫu khô. Như vậy, ở cây lan Kim tuyến 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**

|  |
| --- |
| C:\Users\gam03\Pictures\họi nghi 1-9-2017. (2).png |
| Hình 4: Sắc ký đồ Flavonoid của các mẫu lan Kim tuyến  (Chú thích: 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) |

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 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 5µl. Để tìm hệ dung môi sắc ký phù hợp cho các chế phẩm trên, chúng tôi tiến hành khảo sát triển khai 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 = Toluen : Ethylaxetat : Aceton : Axit formic = 5:2:2:1 (v:v:v:v); Hệ 4 = Ethylaxetat :Toluen:Axit formic:Nước = 7:3:1,5:1 (v:v:v:v).

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 dung môi 4 và quan sát ở các điều kiện khác nhau

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Rf | F-LKT1 | | | | | F-LKT2 | | | | | F-LKT3 | | | | |
| ASTN | UV-254 | FeCl3 | Diazo | Willson | ASTN | UV-254 | FeCl3 | Diazo | Willson | ASTN | UV-254 | FeCl3 | 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/T 2:  0.12 | Vàng + | Đen xám 2+ | Xanh đen 2+ | Hồng tím 4+ | - | Vàng + | Đen xám + | Xanh đen  + | Hồng tím 2+ | - | Vàng + | Đen xám 2+ | Xanh đen 2+ | Hồng tím 2+ | - |
| C/T 3:  0.20 | Vàng + | Đen xám2+ | Xanh đen 4+ | Vàng cam 3+ | - | - | Đen xám+ | Xanh đen  + | Vàng cam + | - | Vàng 2+ | Đen xám3+ | 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 | Vàng2+ | Đen xám 3+ | Xanh đen  + | Vàng + | - | Vàng + | Đen xám + | Xanh đen  + | Vàng + | - | Vàng2+ | 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 | Vàng2+ | Đen xám 3+ | Xanh đen 2+ | Vàng nâu 3+ | P/q VX | Vàng+ | - | - | - | - | Vàng2+ | 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.

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 tuyến 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 Rf > 0,5 tách không rõ ràng, dính sát vào nhau. 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 Rf = 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 (Rf=0.42) và cấu tử 12 (Rf=0.7) nhận thấy không 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 xuất hiện rõ 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 FeCl3, Diazo và Willson đã chứng tỏ đó đều là những 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 vì có 5 cấu tử không thấy xuất hiện trên sắc ký đồ như: cấu tử số 6 (Rf=0.42), cấu tử số 8 (Rf=0.61), cấu tử 11 (Rf=0.67), cấu tử 12 (Rf=0.70) và cấu tử số 14 (Rf=0.83), điều này cũng đã lý giải được là do mẫu LKT2 luôn có hàm lượng Flavonnoid 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. Các chất chống oxy hóa 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 hoá 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 H2O2 trong môi trường axit yếu khi có sự tham gia của enzym peroxydaza ở bước sóng 610 nm 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 10µg/ml-200µg/ml trên nhóm máu O của người - là nhóm máu chiếm tỷ lệ cao của 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)*.

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

Các kết quả thu được ở hình 5 cho thấy, từ nồng độ 50µg/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 150µg/ml đã ức chế 88,2±2,34% hoạt động của enzym; chế phẩm F-LKT1 ức chế 79,68 ± 1,74% hoạt động của enzym và chế phẩm F-LKT2 ức chế 75,35±3,12% hoạt động của enzym. Còn tại nồng độ 200µg/ml, chế phẩm F-LKT1 và F-LKT3 đã gần như kìm hãm hoàn toàn hoạt động của enzym (% ức chế hoạt động enzym ≥ 99,86%), trong khi chế phẩm F-LKT2 có % ức chế hoạt động enzym là 83,5 ±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 nghiên cứu như sau: F-LKT3 > F-LKT1 > F-LKT2.

**4. Kết luận**

Trong dịch chiết Ethanol của các mẫu lan Kim tuyến nghiên cứu đều có chứa hợp chất Flavonoid. Ethanol 60o là dung môi phù hợp (sử dụng ở giai đoạn B3 trong qui 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 : Toluen : Axit formic : Nước = 7:3:1,5:1 (v:v:v:v). Các cấu tử tách ra đều có màu sắc và đặc điểm định tính đặc trưng của nhóm 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.

**5.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 Biol48 3 (2006) 359-363.

[2] Đào Kim Nhung, Đỗ Thị Gấm, Trần Quỳnh Hoa, Trần Nam Thái, Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của Flavonoid chiết xuất từ lá vải (Litchi chinensisi Sonn) và lá nhãn (Dimocarpus longan Lour), Tạp chí Dược học, 394 (2009) 39-43.

[3] Epmakov A.U.u gp, Phytobiochemical 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 Bân, 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 Gam\*1, Ha Viet Hai 2, Chu Hoang Ha3, Pham Bich Ngoc3**

1*Center for high technology development, VAST 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi*

2 *Institute of natural products chemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi*

3*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi*

**Abstract:**

There are flavonoids compositions with high content in*Anoectochilus: Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl: 1.345% (dry weitgh); *Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downiex: 1.044% (dry weitgh); *Anoectochilus anamensis* Aver: 0.903% (dry weitgh). There are 9-14 flavonoids from *A. roxburghii*, *A. lylei* and *A. anamensis* in preliminary analysis the total flavonoids samples by solvent system Ethylaxetate : 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.*