

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO GIÀU FLAVONOID TỪ KIM NGÂN

TS. Phùng Thanh Long¹, DS. Phan Thị Mai²

¹Trường Đại học Hòa Bình

²Trường Đại học Đại Nam

Tác giả liên hệ: ptlong@daihochoabinh.edu.vn

Ngày nhận: 10/12/2023

Ngày nhận bản sửa: 18/12/2023

Ngày duyệt đăng: 21/12/2023

Tóm tắt

Kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) từ lâu đã được người dân Việt Nam sử dụng để chữa bệnh dị ứng, mẩn ngứa, mụn nhọt, rôm sảy ngoài da. Thành phần chính cho tác dụng sinh học của dược liệu này là flavonoid. Tuy được sử dụng rộng rãi, nhưng cho đến nay, chưa có nghiên cứu về quy trình chiết xuất cao kim ngân giàu flavonoid. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được quy trình chiết xuất cao giàu flavonoid từ kim ngân với các thông số đã tối ưu như sau: “dung môi ethanol 70%, nhiệt độ chiết là 60°C, tỉ lệ dược liệu/dung môi 1/10 (g/ml), thời gian chiết là 3 giờ, số lần chiết là 3 lần” dựa trên phương pháp định lượng hàm lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp quang phổ.

Từ khóa: Kim ngân, *Lonicera japonica* Thunb., chiết xuất, flavonoid, tối ưu.

Development for the extraction method of flavonoid rich extract from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.)

Dr. Phung Thanh Long¹, Pharmacist Phan Thi Mai²

¹Hoa Binh University

²Dai Nam University

Corresponding Author: ptlong@daihochoabinh.edu.vn

Abstract

Honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) has long been used by Vietnamese people to treat allergies, rashes, pimples, and heat rash on the skin. The main chemical composition for the biological effects of this medicinal herb is flavonoids. Although widely used, up to now there has been no research on the extraction process of flavonoid-rich extract. In this study, we have built a process to extract flavonoid-rich extract from honeysuckle with the optimized parameters are as follows: “solvent is 70% ethanol, extraction temperature is 60°C, medicinal plant/solvent ratio is 1/10, extraction time is 3 hours, number of extractions is 3 times”, based on the method of quantifying total flavonoid content by photometric method.

Keywords: Honeysuckle, *Lonicera japonica* Thunb., extracts, flavonoids, optimization.

1. Đặt vấn đề

Kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb.) là vị thuốc cổ truyền từ lâu đã được người dân Việt Nam sử dụng để

chữa bệnh dị ứng, mẩn ngứa, mụn nhọt, rôm sảy ngoài da. Thành phần hóa học chính của Kim ngân cũng rất đa dạng, bao gồm acid chlorogenic, flavonoid,

tin dầu... Đặc biệt là nhóm flavonoid với các chất chính như luteolin, chrysoeriol, isorhamnetin, quercetin linocerin [1]. Các flavonoid này có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn [2-3]. Mặc dù đã có nhiều công bố ở Việt Nam và thế giới về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của kim ngân, nhưng cho đến nay, chưa có nghiên cứu về quy trình chiết xuất cao kim ngân tối ưu hóa flavonoid. Điều này dẫn đến việc dược liệu không được chiết kiệt, gây lãng phí nguồn tài nguyên, tăng chi phí, tăng giá thành sản xuất. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu “Xây dựng quy trình chiết xuất cao giàu flavonoid từ kim ngân” với mục tiêu khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất cao kim ngân nhằm tối ưu hóa nhóm hoạt chất flavonoid.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là hoa của cây *Lonicera japonica* Thunb. họ Kim ngân (Caprifoliaceae) thu hái tại Hà Đông, Hà Nội. Mẫu nghiên cứu được Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định tên khoa học. Nguyên liệu sau khi được thu hái về sấy ở nhiệt độ 55°C đến độ ẩm dưới 5%. Bảo quản trong túi PE và để nơi khô thoáng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

Nghiên cứu này khảo sát sự ảnh hưởng của điều kiện chiết xuất bằng phương pháp chiết hồi lưu.

Nguyên liệu kim ngân sau khi sấy khô được xác định hàm ẩm. Sau đó, được cân chính xác một lượng thích hợp. Thêm dung môi, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi tùy theo từng thí nghiệm cụ

thể (trình bày dưới đây). Dịch chiết sau đó được lọc, cất thu hồi dung môi và sấy ở 55°C đến khi hàm ẩm nhỏ hơn 5%. Tiến hành xác định hàm lượng flavonoid trong cao dược liệu theo phương pháp tạo màu với AlCl₃ [4]. Thực hiện khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid: Loại dung môi (methanol, ethanol, nước cất), nồng độ dung môi (50%, 60%, 70%, 80%, 90%), tỉ lệ dược liệu/dung môi (1/10, 1/13, 1/5, 1/18), nhiệt độ (50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C), thời gian chiết (60 phút, 120 phút, 180 phút, 240 phút). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp phân tích

Phương pháp định lượng flavonoid

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp đo quang. Phương pháp này có ưu điểm là đơn giản và nhanh chóng, phù hợp với mục đích chính của nghiên cứu là khảo sát sự thay đổi của hàm lượng của tất cả các flavonoid trong cao chiết kim ngân theo các điều kiện chiết xuất. Nhược điểm chính của phương pháp này là có thể gây ra sai số hệ thống, khi một số hợp chất khác không phải flavonoid cũng cho phản ứng tạo màu. Tuy nhiên, sai số này có thể chấp nhận được nếu khi so sánh các cao của cùng dược liệu trong điều kiện chiết tương đồng. Phương pháp này tiến hành như sau:

Xây dựng đường chuẩn: cân chính xác 10mg quercetin chuẩn hòa tan vào bình định mức 10ml EtOH 96%, rồi dung máy siêu âm cho đồng nhất. Lần lượt hút 0,5ml; 1ml; 1,5ml; 2ml; 2,5ml dung dịch cho bình định mức 10ml đánh số thứ tự 1, 2, 3, 4, 5. Thêm EtOH 96% đến vạch, lắc đều để dung dịch đồng nhất. Tiếp theo, hút 4ml từ bình 1, 2, 3,

4, 5 cho vào bình định mức 10ml đánh số thứ tự 1', 2', 3', 4', 5'. Thêm 0,3ml dung dịch NaNO_2 5% lần lượt các bình 1', 2', 3', 4', 5' chờ trong 5 phút. Thêm tiếp 0,3 ml dung dịch AlCl_3 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, thêm 2ml NaOH 1M và thêm EtOH 96% đến vừa đủ 10ml, lắc đều. Mẫu trắng được pha song song với mẫu chuẩn. Hút 4ml dung dịch EtOH 96% cho vào bình định mức 10ml. Sau đó, thêm 0,3 ml dung dịch NaNO_2 5% chờ trong 5 phút. Thêm tiếp 0,3 ml dung dịch AlCl_3 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, thêm 2ml dung dịch NaOH 1M và thêm dung dịch EtOH 96% đến vừa đủ 10ml, lắc

đều. Tiến hành xác định độ hấp thụ của mẫu trắng và mẫu thử bằng máy đo quang ở bước sóng 510nm. Từ đó, xây dựng đường chuẩn quercetin.

Thí nghiệm với mẫu cao được liệu (1mg/ml): Thực hiện tiến trình thí nghiệm tương tự như với quercetin.

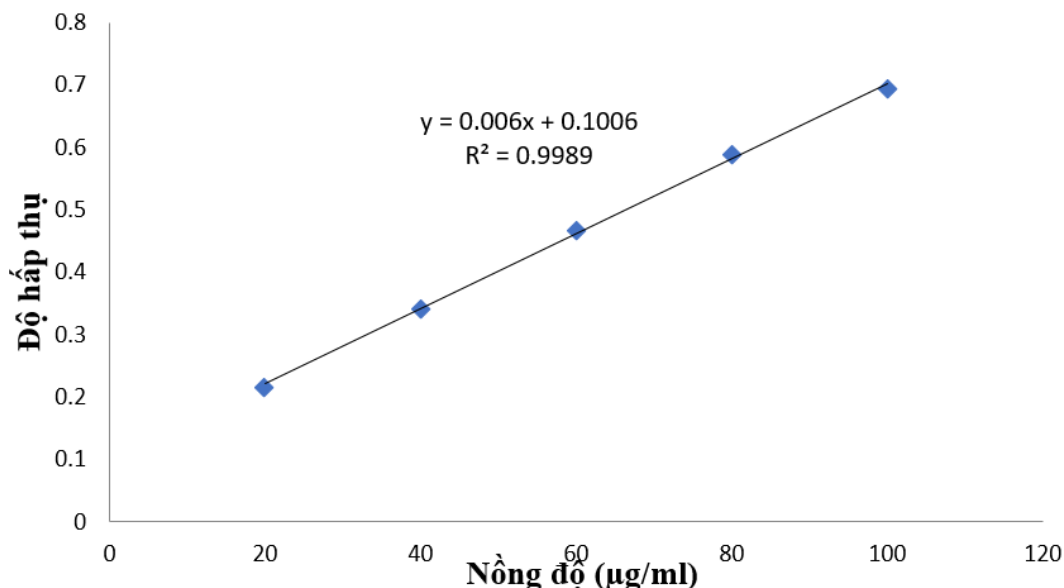
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng đường chuẩn quercetin

Để xác định khoảng tuyến tính, chất chuẩn quercetin được pha thành dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 20; 40; 60; 80; 100 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành thí nghiệm như đã mô tả tại mục 2.3. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Độ hấp thụ của quercetin phụ thuộc nồng độ

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	20	40	60	80	100
Độ hấp thụ	0,216	0,341	0,468	0,589	0,694



Hình 1. Đồ thị biểu thị mối tương quan giữa độ hấp thụ với nồng độ quercetin

Kết quả Bảng 1 và Hình 1 cho thấy độ hấp thụ và nồng độ dung dịch quercetin có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ trong khoảng nồng độ từ 20 đến 100 $\mu\text{g/ml}$ theo phương trình $y =$

$0,006x + 0,1006$, với $R^2 = 0,9989$. Do đó, phương pháp quang phổ được sử dụng để định lượng flavonoid toàn phần tại bước sóng 510nm.

3.2. Khảo sát dung môi chiết

Tiến hành thí nghiệm ở nhiệt độ 80°C với tỉ lệ dược liệu/dung môi 1/10 (g/ml), thời gian chiết là 1 giờ, số lần chiết là 1. Kết quả cho thấy, hàm lượng flavonoid tính trên 1g dược liệu (mg/g) của cả 2 loại dung môi ethanol và methanol là

xấp xỉ bằng nhau. Tuy nhiên, ethanol được sử dụng rộng rãi hơn do ít độc hại hơn methanol. Do vậy, chúng tôi chọn dung môi cho đề tài này là ethanol. Kết quả khảo sát dung môi được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Sự ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Dung môi	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
Ethanol	36,642 ± 0,494
Methanol	36,547 ± 1,021
Nước	4,155 ± 0,799

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$.

3.3. Khảo sát nồng độ dung môi

Tiếp tục tiến hành khảo sát nồng độ dung môi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ethanol trong nước, với các điều kiện: nhiệt độ 80°C, tỉ lệ dược liệu/dung môi 1/10 (g/ml), thời gian chiết là 1 giờ, số lần chiết là 1.

Kết quả cho thấy, ở nồng độ dung môi ethanol 70% thì hàm lượng flavonoid tính trên 1g dược liệu (mg/g) là cao nhất 39.638 ± 0.869. Kết quả khảo sát dung môi được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Sự ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Nồng độ dung môi	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
50%	26,605 ± 0,487
60%	28,482 ± 0,733
70%	39,638 ± 0,869
80%	37,957 ± 1,038
90%	33,981 ± 0,524

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$.

3.4. Khảo sát nhiệt độ chiết

Nhiệt độ làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của các hợp chất, làm giảm độ nhớt dung môi, tăng khả năng truyền khối và xâm nhập của dung môi vào trong tế bào. Tuy nhiên, nhiệt độ cao cũng làm phân hủy và mất hoạt

tính của một số hoạt chất. Đặc biệt là flavonoid, do hợp chất này kém bền với nhiệt. Sau khi lựa chọn được dung môi thích hợp ethanol 70%, tiếp tục khảo sát ở các nhiệt độ chiết lần lượt là 50, 60, 70, 80, 90°C. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Nhiệt độ	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
50°C	47,763 ± 0,979
60°C	53,904 ± 0,515
70°C	49,731 ± 0,691
80°C	43,709 ± 1,045
90°C	31,317 ± 0,426

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$

Kết quả Bảng 4 chỉ ra rằng, khi nhiệt độ chiết xuất tăng từ 50 °C đến 60°C thì hàm lượng flavonoid tăng. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng từ 60°C đến 90°C thì hàm lượng flavonoid giảm. Điều này có thể lý giải là do các hợp chất flavonoid thường kém

bền với nhiệt độ. Do vậy, lựa chọn 60°C là nhiệt độ chiết xuất tối ưu.

3.5. Khảo sát tỉ lệ dược liệu/dung môi

Sau khi lựa chọn được dung môi và nhiệt độ tối ưu, tiếp tục khảo sát tỷ lệ nguyên liệu/dung môi với các tỷ lệ (1/10, 1/13, 1/15, 1/18). Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Sự ảnh hưởng tỉ lệ dược liệu/dung môi đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Tỉ lệ dược liệu/dung môi (g/ml)	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
1/10	51,518±6,365
1/13	59,041±0,392
1/15	61,449±0,319
1/18	61,953±0,603

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$.

Thực tế nghiên cứu cho thấy, khi tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi lên từ 1/10 đến 1/18, hàm lượng flavonoid thu được tăng lên đáng kể. Nhưng tăng tỉ lệ từ 1/13 lên 1/18 thì hàm lượng flavonoid tăng nhưng không có sự khác biệt khi xử lý thống kê. Do đó, để tiết kiệm chi phí cũng như thuận tiện hơn ở giai đoạn sau, lựa chọn tỷ lệ 1/13 là tối ưu nhất.

3.6. Khảo sát thời gian

Khi tiến hành chiết, các chất có kích

thước phân tử (thường là hoạt chất) sẽ được hòa tan và khuếch tán vào dung môi trước, sau đó, mới đến các chất kích thước lớn hơn (thường là tạp như nhựa, keo...). Khi thời gian kéo dài thì lượng chất khuếch tán tăng, nhưng cũng tăng lượng tạp chất. Nếu kéo dài thời gian cũng sẽ không mang lại hiệu quả kinh tế. Do vậy, cần khảo sát thời gian chiết là 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ. Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Sự ảnh hưởng thời gian chiết đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Thời gian (giờ)	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
1	61,918±0,722
2	65,564±1,298
3	67,786±0,456
4	68,806±0,456

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$.

Từ Bảng 6 cho thấy, khi thời gian chiết tăng thì hàm lượng flavonoid cũng tăng theo, nhưng từ 3 giờ đến 4 giờ thì hàm lượng flavonoid tăng nhưng không có sự khác biệt. Trong quá trình chiết, thời gian chiết quá ngắn sẽ không bảo đảm được hiệu suất tách chiết. Ngược lại, nếu thời gian chiết quá dài sẽ làm tăng khả năng phân hủy các chất. Ngoài ra, thời gian chiết quá dài cũng gây tốn kém về mặt kinh tế. Vì vậy, thời gian là 3 giờ được chọn cho quá trình chiết flavonoid từ kim ngân.

3.7. Khảo sát số lần chiết/mẻ

Số lần chiết xuất cũng ảnh hưởng lớn đến hàm lượng flavonoid trong dược liệu. Chiết xuất là quá trình khuếch tán phân tử, chất cần chiết xuất hòa tan vào dung môi và khuếch tán ra khỏi tế bào. Khi chất tan đạt nồng độ cân bằng giữa trong và ngoài tế bào thì quá trình chiết kết thúc. Qua đó, việc khảo sát số lần chiết là rất cần thiết để đảm bảo dược liệu được chiết kiệt cũng như tiết kiệm được thời gian và chi phí. Tiến hành khảo sát ở các lần chiết/mẻ 1, 2, 3, 4 lần. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Sự ảnh hưởng số lần chiết đến hàm lượng flavonoid trong cao kim ngân

Số lần	Hàm lượng flavonoid chiết được tính trên 1g dược liệu (mg/g)
1	68,117±0,571
2	22,514±0,581
3	9,755±0,489
4	0,415±0,305

Số liệu được trình bày dưới dạng $M \pm SD$, với $n = 3$.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất lần 1 đạt hàm lượng Flavonoid/dược liệu là cao nhất (68.117±0.571) và giảm dần sau các lần 2, 3, 4. Đến lần 4 thì hàm lượng thu được rất thấp và không đáng kể. Do đó, quá trình chiết xuất chỉ nên dừng lại 3 lần cho mỗi mẻ.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố: dung môi, nồng độ dung môi, nhiệt độ, tỷ lệ

dược liệu/dung môi, thời gian, số lần chiết/mẻ đến hàm lượng flavonoid từ hoa của cây kim ngân. Kết quả cho thấy, các yếu tố này đều ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid. Quy trình chiết xuất cao giàu flavonoid từ kim ngân với các thông số đã tối ưu như sau: dung môi ethanol 70%, nhiệt độ chiết là 60°C, tỉ lệ dược liệu/dung môi 1/10 (g/ml), thời gian chiết là 3 giờ, số lần chiết là 3 lần.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Đỗ Tất Lợi (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, Hà Nội, tr.358-360.
- [2]. Trần Công Khánh và cộng sự (2010). *Cẩm nang sử dụng và phát triển cây thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, tr 221-222.
- [3]. Yang Z. Z., Yu Y. T. (2018). “*Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*”. *Free Radical Biology and Medicine*, 129, p. 310-322.
- [4]. Đỗ Thị Hà, Vũ Thị Diệp, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Thu, Trần Ngọc Lâm (2018). “Phân tích định tính và định lượng flavonoid trong thân rễ ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker) bằng sắc ký lớp mỏng và phương pháp quang phổ”, *Tạp chí Dược học*, 58 (12), tr. 25-29.