 doi: 10.47866/2615-9252/vjfc.4116

Nghiên cứu đặc điểm vi học và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid chiết xuất từ lá cây nhội (*Bischofia javanica* Blume) tại Lâm Đồng

Trần Mộng Tố Tâm[1*], Đinh Thị Thanh Vy[2], Huỳnh Hoàng Duy[3], Đỗ Thị Thùy Trang[3], Huỳnh Thị Tú Anh[1], Lê Thị Ái Vy[1], Trương Tuấn Khải[1], Lại Lộc Hưng Phát[1]

[1]Khoa Dược - Điều dưỡng, Trường Đại học Yersin Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

[2]Trung tâm Thí nghiệm - Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

[3]Khoa Sinh học - Môi trường, Trường Đại học Yersin Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 23/4/2023; Ngày chấp nhận đăng: 28/6/2023)

Tóm tắt

Trong những năm gần đây, việc sử dụng thảo dược tự nhiên trong điều trị bệnh tại Việt Nam rất được quan tâm. Việc nghiên cứu thành phần hóa học, đặc điểm vi học và chiết xuất các thành phần có hoạt tính từ nguồn nguyên liệu đóng vai trò quan trọng trong ứng dụng điều trị bệnh. Nghiên cứu này tiến hành mô tả đặc điểm vi phẫu của lá nhội tươi bằng phương pháp nhuộm kép, soi bột lá dưới kính hiển vi, sơ bộ xác định thành phần hóa học bằng phản ứng hóa học, khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố nồng độ ethanol, thời gian, nhiệt độ và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi đến quy trình chiết xuất flavonoid từ lá nhội. Bằng các phản ứng hóa học đặc trưng, sơ bộ xác định thành phần của lá nhội gồm có các nhóm chất flavonoid, phenolic, tannin, steroid, protein, carbohydrat và anthranoid. Vi phẫu lá nhội tươi và soi bột lá nhội dưới kính hiển vi xác định được các thành phần cấu trúc đặc trưng gồm biểu bì, lỗ khí, mô dày, mô mềm, mô cứng, bó libe - gỗ và các mảnh mạch. Điều kiện phù hợp để chiết xuất flavonoid từ lá cây nhội bao gồm dung môi chiết xuất là ethanol 50%, thời gian chiết xuất 3 giờ, nhiệt độ 60 °C và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi 1 : 30 g/mL. Kết quả nghiên cứu là nguồn thông tin quan trọng góp phần nhận biết, tiêu chuẩn hóa và phát triển thuốc mới từ nguồn dược liệu địa phương.

Từ khóa: *lá nhội, Bischofia javanica Blume, thành phần hóa học, đặc điểm vi học, flavonoid.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây nhội có tên khoa học *Bischofia javanica* Blume thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae). Cây nhội tự nhiên đặc biệt phát triển tốt ở các vùng khí hậu ôn đới với địa

[*]Điện thoại: 0984975793 *Email: totamtran910@gmail.com*

hình núi cao như tại vùng núi Himalaya, Ấn Độ, khu vực vùng núi phía bắc ở Indonesia [1]. Cây thường được trồng lấy bóng mát trong nhiều thành phố ở nước ta, nhiều nhất ở Hà Nội, hoặc mọc hoang trong rừng. Lá được dùng làm thuốc, có thể hái quanh năm, tốt nhất vào lúc cây đang ra hoa. Quả có thể ăn được [2]. Dịch chiết lá nhội có tác dụng ức chế dòng tế bào ung thư máu ở người, kháng oxy hóa và kháng viêm tốt [3, 4]. Đặc biệt một số nghiên cứu cho thấy dịch chiết lá và vỏ thân cây nhội có thể làm giảm đường huyết trên mô hình chuột thử nghiệm [5-7]. Nghiên cứu tại Trường Đại học Y Hà Nội (1963) về những vị thuốc có khả năng trừ giun sán và các ký sinh trùng khác cho kết quả lá nhội có tác dụng rất mạnh đối với trùng roi (*Trichomonas vaginalis*); đã áp dụng điều trị thí nghiệm bệnh tiêu chảy của khỉ do lỵ trực trùng, kết quả khỏi đạt 88% trên người, dùng chữa khí hư do trùng roi, kết quả có nhiều triển vọng và độc tính rất thấp [2]. Tác giả Ati và cộng sự (2020) nghiên cứu thành phần hóa học từ dịch chiết vỏ thân của cây nhội trồng tại Indonesia bao gồm polyphenol, flavonoid, saponin, steroid/terpenoid, alkaloid [8]. Tác giả Sarmah và cộng sự nghiên cứu thành phần dịch chiết lá nhội, kết quả cho thấy có các nhóm saponin, steroid, glycosid, terpenoid, polyphenol, tannin, flavonoid, protein, carbohydrat [9]. Ở Việt Nam, một vài nghiên cứu đã phân lập được một số hợp chất phenolic từ cây nhội như ursolic acid, betulinic acid, chrysoeriol, quercetin… [10, 11].

Flavonoid là những hợp chất polyphenol được tìm thấy trong nhiều loại dược liệu, là một phân lớp lớn gồm khoảng 8.000 hợp chất. Flavonoid là những chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học của thực vật được biết đến là những thành phần tạo màu sắc và mùi của hoa. Các hợp chất nhóm flavonoid thể hiện nhiều tác dụng sinh học quan trọng như hạ đường huyết, kháng virus, chống dị ứng, kháng khuẩn, kháng viêm… [12, 13].

Cây nhội có tiềm năng ứng dụng làm thuốc cao nhưng hiện nay chưa được quan tâm phát triển nhiều, trong nước có rất ít nghiên cứu về đặc điểm thực vật cũng như thành phần, tác dụng của cây nhội. Chính vì vậy, nghiên cứu này tiến hành khảo sát sơ bộ thành phần hóa học, đặc điểm vi học và một số yếu tố ảnh hưởng quy trình chiết xuất flavonoid từ lá cây nhội, góp phần tiêu chuẩn hóa nguồn dược liệu địa phương tại tỉnh Lâm Đồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá cây nhội được thu hái tại thôn Cầu Đất, xã Xuân Trường, thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu được xác định tên khoa học *Bischofia javanica* bởi ThS. Trần Thị Tâm, khoa Sinh học - Môi trường, trường Đại học Yersin Đà Lạt, theo mô tả trong tài liệu Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam của tác giả Đỗ Tất Lợi [2]. Lá được rửa sạch, lá tươi được dùng làm thử nghiệm nhuộm vi phẫu, phần còn lại được sấy khô bằng tủ sấy ở nhiệt độ 50-60 °C, xay thành bột thô. Độ ẩm bột được xác định bằng cân sấy ẩm hồng ngoại là 9,3% (Lượng dược liệu sử dụng: 1,0 g, nhiệt độ: 105-110 °C, thời gian: 30 phút).

2.2. Hóa chất

Ethanol, methanol, carmin 40, lục iod, cloramin T, cloral hydrat, acid acetic, NaOH, HCl, H_2SO_4, HNO_3, $AlCl_3$, $FeCl_3$, Mg kim loại, anhydrid acetic, gelatin muối, thuốc thử Keller-Kiliani, thuốc thử Baljet, dichloromethan, chloroform, thuốc thử Dragendoff, thuốc thử Valse-Mayer, thuốc thử Fehling, kali acetat (CH_3COOK), nước cất, chất chuẩn quercetin (Sigma-Aldrich).

2.3. Thiết bị

Kính hiển vi điện tử, tủ sấy Memmert (Đức), cân phân tích Ohaus (Mỹ), máy quang phổ UV-Vis Labomed UVS 2800 (Mỹ), bếp cách thủy Memmert WNB14 (Đức), đèn soi UV Vilber Lourmat (Pháp), dụng cụ thủy tinh.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khảo sát sơ bộ thành phần hóa học

Thành phần hóa học được xác định sơ bộ bằng một số phản ứng hóa học đặc trưng [14].

- Glycosid tim: Cân 5 g bột lá, đun cách thủy với cồn 50%, lọc qua bông thu dịch chiết, lắc với chloroform, bốc hơi đến cắn. Tiến hành phản ứng Keller-Kiliani và phản ứng Baljet. Quan sát màu sắc các phản ứng, đánh giá kết quả.

- Saponin: Cân 1 g bột lá, đun cách thủy nhẹ với cồn 70%, lọc qua bông thu dịch chiết, tiến hành phản ứng tạo bọt, quan sát lớp bọt và đánh giá kết quả.

- Anthranoid: Cân 1 g bột lá, chiết với nước sôi, đun cách thủy với acid, lắc với DCM, gạn lấy dịch, thêm dung dịch NaOH 10%, lắc kỹ. Quan sát sự chuyển màu lớp kiềm, đánh giá kết quả.

- Coumarin: Cân 1 g bột lá, đun cách thủy với cồn 96%, lọc qua bông thu dịch chiết. tiếp tục đun cách thủy với dung dịch NaOH 5%, nhỏ dịch chiết lên tờ giấy lọc. So sánh sự phát quang ở phần giấy lọc che và không che miếng kim loại dưới đèn UV 365 nm và đánh giá kết quả.

- Flavonoid: Cân 1 g bột lá, chiết với cồn 96% thu dịch chiết. Tiến hành phản ứng trên giấy lọc và trong ống nghiệm với dung dịch NaOH 1%, $AlCl_3$ 1%, $FeCl_3$ 1%, phản ứng với chì acetat trung tính và phản ứng Cyanidin chỉ thực hiện trong ống nghiệm. Quan sát giấy lọc dưới đèn UV 365 nm, sự thay đổi màu, tạo tủa của các phản ứng trong ống nghiệm, đánh giá kết quả.

- Polyphenol: Cân 1 g bột lá, đun cách thủy với cồn 96% thu dịch chiết. Tiến hành phản ứng tạo phức với dung dịch $FeCl_3$ 5%. Quan sát màu sắc của dung dịch và đánh giá kết quả.

- Tannin: Cân 1 g bột lá, chiết với nước sôi. Tiến hành phản ứng với thuốc thử gelatin muối. Quan sát sự hình thành tủa trong dung dịch, đánh giá kết quả.

- Alkaloid: Cân 2 g bột lá, kiềm hóa bằng amoniac đậm đặc, chiết với chloroform, lắc với nước acid, cho các thuốc thử Dragendoff, Valse-Mayer. Quan sát sự tạo tủa, đánh giá kết quả.

- Steroid: Cân 5 g bột lá, đun cách thủy với cồn 50%. Lắc dịch chiết với chloroform, tiến hành phản ứng với anhydrid acetic và acid sulfuric đậm đặc. Quan sát màu và đánh giá kết quả.

- Protein: Cân 1 g bột lá, đun cách thủy với ethanol 50%, tiến hành phản ứng với dung dịch acid nitric. Quan sát sự chuyển màu và đánh giá kết quả.

- Carbohydrat: Cân 1 g bột lá, đun cách thủy với ethanol 50%, tiến hành phản ứng Fehling. Quan sát kết tủa và đánh giá kết quả.

2.4.2. Khảo sát đặc điểm vi học

Đặc điểm vi học của lá nhội được xác định bằng phương pháp nhuộm vi phẫu mẫu tươi và soi bột khô dưới kính hiển vi.

Vi phẫu lá nhội tươi

Mẫu tiêu bản lá nhội tươi được vi phẫu và nhuộm theo quy trình cụ thể được quy định trong Dược điển Việt Nam V, phụ lục 12.18 [15]. Mẫu tiêu bản là một đoạn gân giữa có dính mỗi bên một ít lá. Nhuộm kép bằng dung dịch lục iod và dung dịch carmin 40. Soi mẫu tiêu bản trên kính hiển vi, xác định các thành phần đặc trưng của mẫu.

Soi bột lá nhội

Bột lá nhội sau khi xác định độ ẩm được soi dưới kính hiển vi theo quy trình cụ thể được quy định trong Dược điển Việt Nam V, phụ lục 12.18 [15]. Xác định các thành phần cấu tử đặc trưng của bột.

2.4.3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid từ lá nhội

Quy trình chiết xuất

Cân chính xác khoảng 0,2 g bột lá nhội cho vào erlen 100 mL, tiến hành chiết xuất bằng dung môi ethanol với các nồng độ, thời gian, nhiệt độ và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi cần khảo sát thu được các dịch chiết lá nhội. Tiến hành khảo sát nồng độ ethanol 10-96%, thời gian 15 phút-5 giờ, nhiệt độ 20-80 °C và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi 1 : 5 đến 1 : 60 (g/mL). Ở mỗi bước thay đổi thông số cần khảo sát, cố định thông số các yếu tố còn lại. Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần từ dịch chiết lá nhội

Hàm lượng flavonoid trong dịch chiết lá nhội được xác định bằng phương pháp tạo phức với $AlCl_3$ theo quy trình của Chang và cộng sự có điều chỉnh [16].

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác 10 mg chất chuẩn quercetin, hòa tan trong 10 mL methanol để được nồng độ 1.000 mg/L. Pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành các dung dịch chuẩn quercetin có nồng độ 1, 2, 5, 10 và 20 mg/L. Mỗi dung dịch chuẩn lấy 1 mL, thêm 3 mL methanol, 0,2 mL dung dịch $AlCl_3$ 10%, 0,2 mL dung dịch CH_3COOK 1 M, bổ sung nước cất vừa đủ 10 mL. Ủ mẫu 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thu quang phổ UV-Vis ở bước sóng 415 nm, mẫu trắng thực hiện giống mẫu thử nhưng không có dung dịch $AlCl_3$. Lập phương trình đường chuẩn, xác định hệ số tương quan R^2.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân 25 mg cao chiết hòa tan trong 10 mL methanol. Các bước tiếp theo thực hiện tương tự quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn, mẫu trắng không có dung dịch $AlCl_3$. Tính hàm lượng flavonoid trong dịch chiết theo phương trình đường chuẩn đã xây dựng, hàm lượng flavonoid được tính bằng miligam quercetin/g bột lá khô.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel 365. Tiến hành phân tích so sánh sự khác biệt hàm lượng flavonoid chiết được ($\alpha = 0,05$) bằng phần mềm SPSS Statistic 20.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

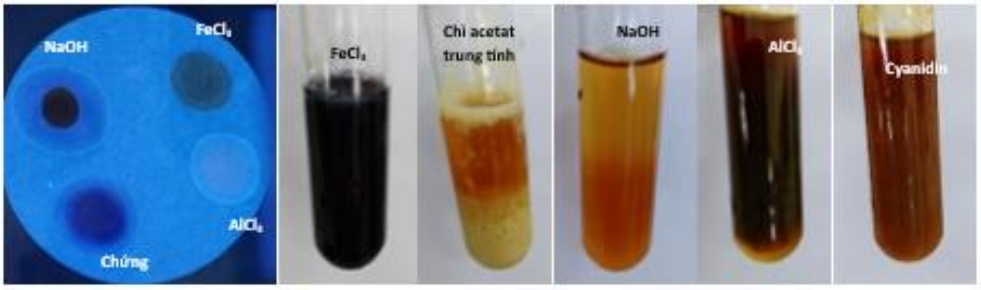
3.1. Thành phần hóa học

Thành phần hóa học lá nhội xác định bằng phản ứng hóa học được đưa ra tại Bảng 1.

Bảng 1. *Thành phần hóa học lá nhội xác định bằng phản ứng hóa học*

Thành phần	*Phản ứng*	*Kết quả*	*Kết luận*
Glycosid tim	Phản ứng Keller - Kiliani Phản ứng Baljet	Không có phản ứng	-
Saponin	Phản ứng tạo bọt	Không tạo bọt	-
Anthranoid	**Phản ứng dung dịch NaOH**	**Lớp kiềm có màu đỏ**	+
Coumarin	Phản ứng dung dịch NaOH Phản ứng huỳnh quang	Không có phản ứng Không phát huỳnh quang	- -
Flavonoid	**Với dung dịch NaOH** **Với dung dịch $FeCl_3$** **Với dung dịch $AlCl_3$** **Phản ứng cyanidin** **Với chì acetat trung tính**	**Dung dịch tăng màu, phát huỳnh quang dưới UV 365 nm** **Dung dịch màu đỏ cam** **Dung dịch màu xanh đen** **Dung dịch tăng màu, phát huỳnh quang mạnh dưới UV 365 nm** **Dung dịch màu đỏ cam** **Có kết tủa**	++
Polyphenol	**Phản ứng với $FeCl_3$**	**Dung dịch màu xanh đen**	+++
Tannin	**Phản ứng gelatin muối**	**Có kết tủa**	+
Alkaloid	Thuốc thử chung alkaloid	Không có kết tủa	-
Steroid	**Phản ứng với H_2SO_4 đậm đặc**	**Dưới vòng ngăn cách màu hồng, phía trên xanh lá**	++
Protein	**Phản ứng với acid nitric**	**Dung dịch màu vàng**	+
Carbohydrat	**Phản ứng Fehling**	**Kết tủa màu đỏ**	++

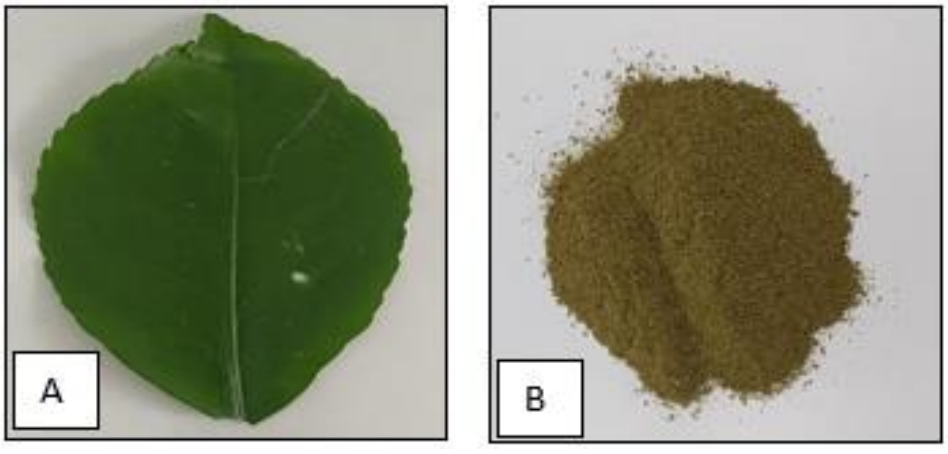
Dựa vào phản ứng với các thuốc thử tạo màu, tạo tủa đặc trưng, sơ bộ xác định được trong dịch chiết lá nhội chứa các nhóm hợp chất tannin, anthranoid, flavonoid, polyphenol, steroid, protein và carbohydrat, đặc biệt polyphenol, flavonoid, steroid và carbohydrat có hàm lượng khá cao. Kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của Sarmah và cộng sự về thành phần hóa học của dịch chiết lá nhội ở Ấn Độ, trong dịch chiết còn có saponin và glycosid [9]. Tuy nhiên, thành phần hóa học của dược liệu có thể thay đổi do nhiều yếu tố, đặc biệt là loại dung môi chiết xuất và lượng nguyên liệu khác nhau. Ngoài ra, có thể các chất này có trong mẫu nghiên cứu nhưng hàm lượng quá thấp, không phát hiện được bằng phản ứng hóa học. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong lá nhội có chứa một số thành phần hoạt chất, đặc biệt là polyphenol và flavonoid, có tiềm năng trong điều chế dược phẩm và ứng dụng trị liệu. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu ở Việt Nam cũng như trên thế giới xác định trong lá nhội có chứa flavonoid [12, 13, 17-18]. Phản ứng hóa học định tính flavonoid trên giấy lọc và trong ống nghiệm được đưa ra tại Hình 5.



Hình 5. *Phản ứng hóa học định tính flavonoid trên giấy lọc và trong ống nghiệm*

3.2. Đặc điểm vi học

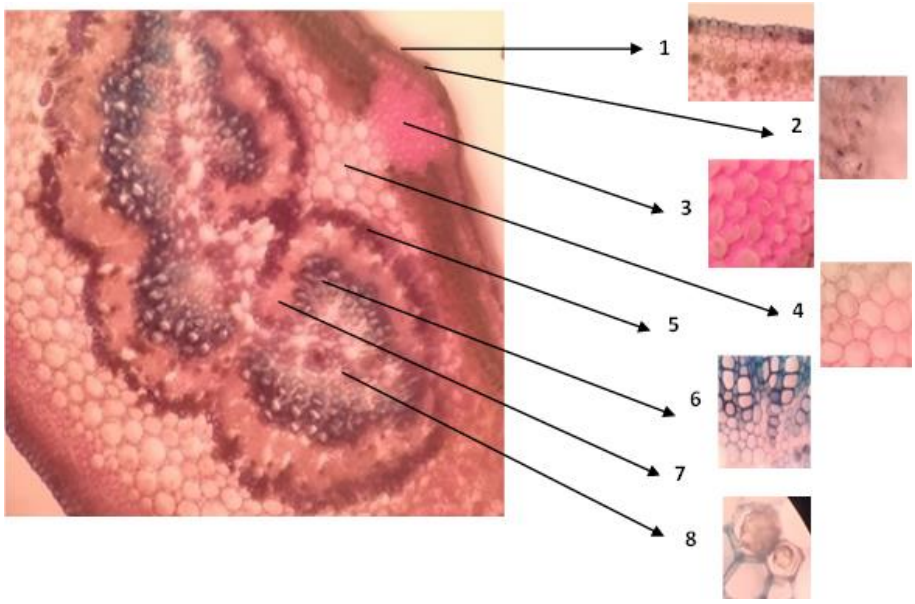
Hình 2 cho thấy đặc điểm lá nhội tươi và bột lá khô. Lá tươi dài khoảng 15-25 cm, màu xanh, viền răng cưa, phiến lá hình bầu dục, chóp nhọn. Bột lá có màu nâu vàng.



Hình 2. *Đặc điểm lá nhội tươi (A) và bột lá nhội (B)*

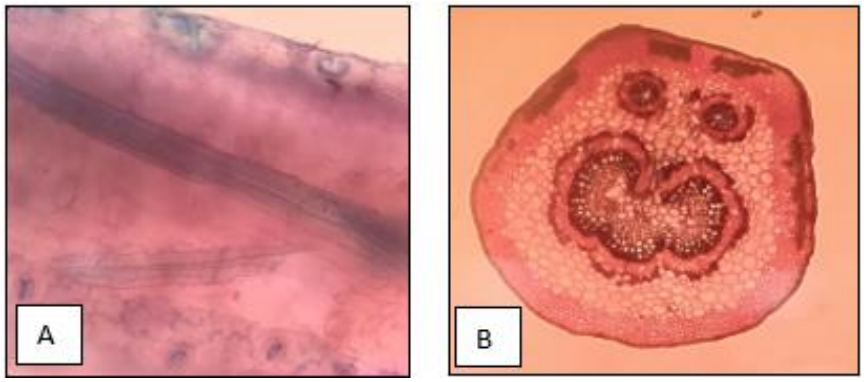
3.2.1. Vi phẫu lá nhội tươi

Kết quả nhuộm vi phẫu và nhuộm kép với đỏ carmin và lục iod lá nhội tươi được trình bày trong Hình 3 và Hình 4.



Hình 3. *Hình ảnh vi phẫu gân lá dưới kính hiển vi*
1. Biểu bì, 2. Lỗ khí, 3. Mô dày, 4. Mô mềm, 5. Mô cứng, 6. Gỗ, 7. Libe, 8. Tinh thể calci oxalat

Quan sát dưới kính hiển vi, gân lá mặt dưới hơi lồi, mặt trên lồi nhiều. Biểu bì trên và dưới gồm một lớp tế bào hình chữ nhật kèm lỗ khí. Dưới biểu bì là lớp mô mềm giậu và mô dày tròn có thành tế bào dày. Mô mềm gồm các tế bào hình đa giác hoặc hình trứng. Mô cứng tạo thành một vòng bao quanh libe - gỗ. Libe - gỗ dạng bó chồng xếp đồng tâm. Ngoài ra trong gân lá còn có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai.

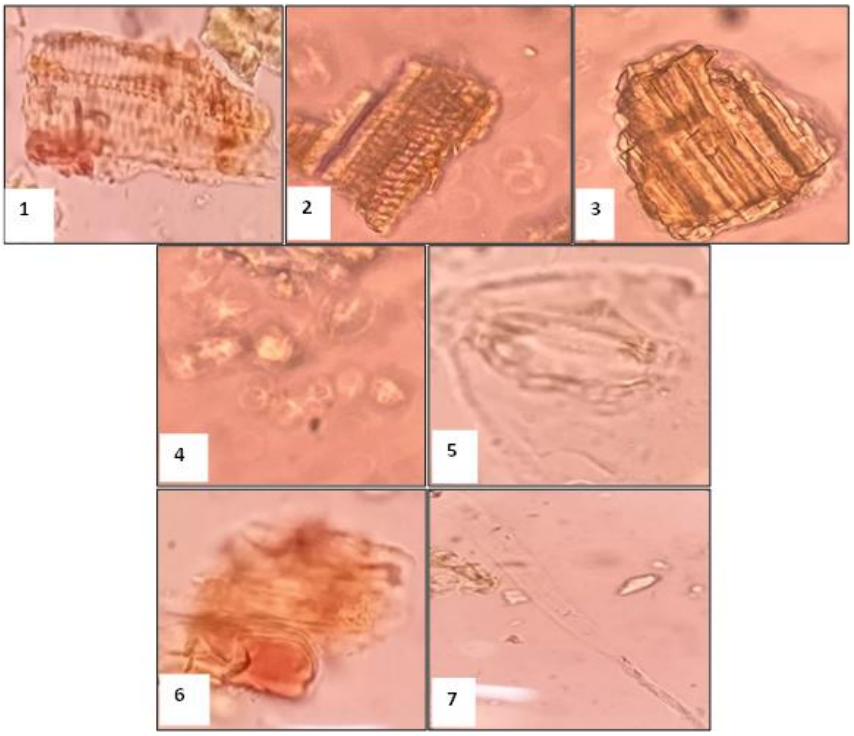


Hình 4. *Hình ảnh vi phẫu phiến lá (A) và cuống lá (B) dưới kính hiển vi*

Phiến lá gồm biểu bì có cấu tạo từ một hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn, trên biểu bì rải rác có lỗ khí, trong phiến lá có các bó mạch. Biểu bì cuống lá có một lớp tế bào hình đa giác dẹp, kích thước không đều, ngay dưới biểu bì là nhiều lớp tế bào mô dày kích thước không đều, bó libe - gỗ chồng xếp đồng tâm, bên ngoài là một vòng mô cứng, một số bó mạch nằm trong lớp mô dày gần biểu bì.

3.2.2. Soi bột lá nhội

Các thành phần cấu tử đặc trưng của bột lá nhội dưới kính hiển vi được đưa ra tại Hình 5.



Hình 5. *Các thành phần cấu tử đặc trưng của bột lá nhội dưới kính hiển vi*

1. Mạch điểm, 2. Mạch vạch, 3. Bó gỗ, 4. Tinh bột, 5. Lỗ khí, 6. Khối nhựa mủ, 7. Lông che chở

Mỗi dược liệu có những đặc điểm mô học đặc trưng được thể hiện một phần qua đặc điểm của bột khô. Phân biệt các dược liệu thông qua đặc điểm bột dược liệu là rất quan trọng, giúp đảm bảo chất lượng và độ tinh khiết của dược liệu, từ đó đảm bảo tính hiệu quả và an toàn của sản phẩm. Hình 5 cho thấy bột lá nhội có các cấu tử đặc trưng của lá bao gồm các mảnh mạch (mạch điểm và mạch vạch), bó mạch gỗ, hạt tinh bột hình đa giác, mảnh biểu bì có lỗ khí, mảnh nhựa mủ có màu nâu đỏ và lông che chở đơn bào. Kết quả cho thấy bột lá nhội có các cấu tử tương tự thành phần cấu trúc đã quan sát được khi nhuộm vi phẫu mẫu lá tươi. Hiện tại chưa có tài liệu chính thức công bố tiêu chuẩn dược liệu lá nhội. Vì vậy, các đặc điểm mô học này có thể được sử dụng như một tiêu chí trong việc xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu này trong tương lai.

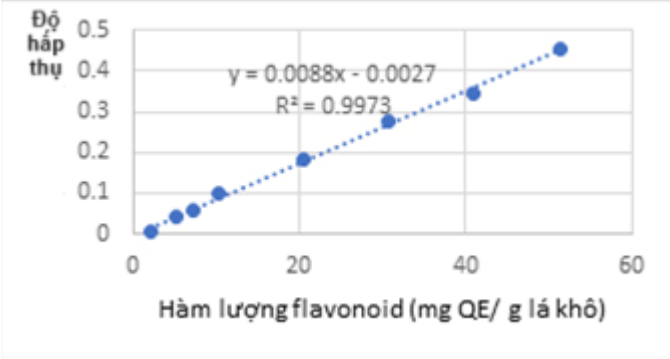
3.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid toàn phần từ lá nhội

Để xác định các điều kiện chiết xuất flavonoid từ lá nhội cho hàm lượng cao nhất, chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid thu được từ lá nhội. Loại dung môi sử dụng chiết xuất là một trong những yếu tố quan trọng nhất để chiết xuất một nhóm hoạt chất từ dược liệu. Các dung môi thường được sử dụng trong chiết xuất hoạt chất từ dược liệu gồm có nước, ethanol và methanol. Methanol có khả năng hòa tan và lôi kéo các hoạt chất khỏi tế bào tốt hơn ethanol. Tuy nhiên, methanol có độc tính cao hơn, dễ ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Trong khi đó, nước có độ phân cực cao nên dễ hòa tan nhiều tạp chất phân cực, ảnh hưởng đến độ tinh khiết của hoạt chất chiết. Do đó, ethanol được chọn là dung môi dùng chiết xuất flavonoid từ lá nhội, tiến hành khảo sát ảnh hưởng

của nồng độ ethanol được sử dụng, thời gian, nhiệt độ chiết xuất và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi đến hàm lượng flavonoid chiết xuất được từ lá nhội.

3.3.1. Phương trình đường chuẩn quercetin

Phương trình đường chuẩn độ hấp thụ theo hàm lượng flavonoid được đưa ra tại Hình 6.

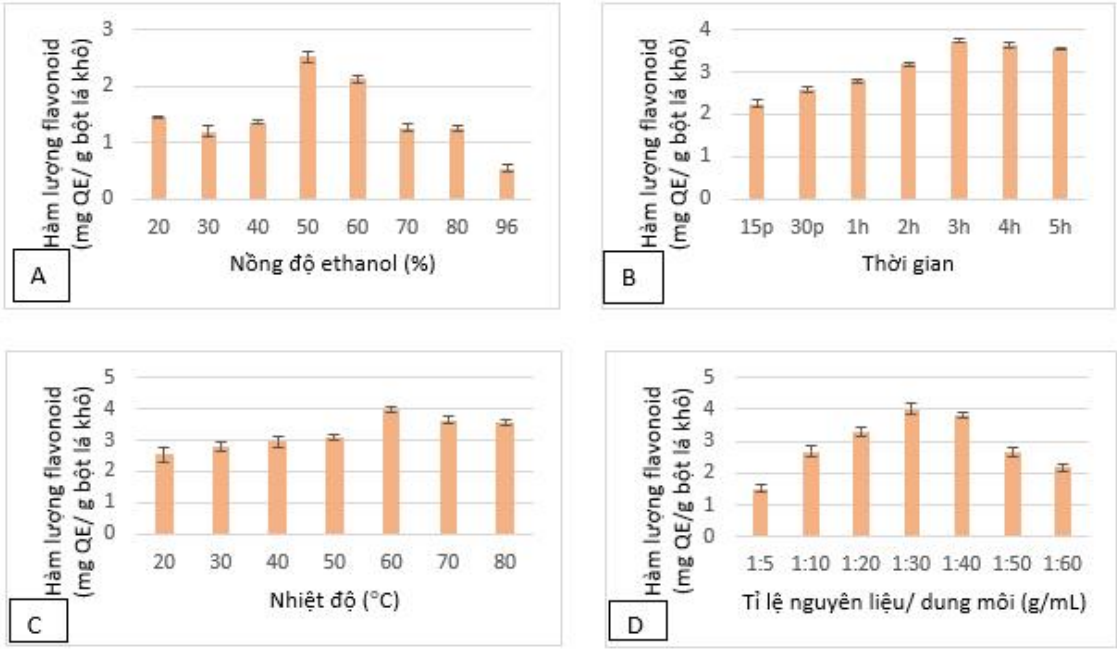


Hình 6. *Phương trình đường chuẩn độ hấp thụ theo hàm lượng flavonoid*

Để xác định hàm lượng flavonoid trong dịch chiết lá nhội, chúng tôi xây dựng đường chuẩn từ chất chuẩn quercetin. Kết quả từ Hình 6 cho thấy phương trình đường chuẩn quercetin là y = 0,0088x - 0,0027 với giá trị R^2 = 0,9973 > 0,99. Phương trình đường chuẩn phù hợp để xác định hàm lượng flavonoid từ lá nhội.

3.3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid chiết xuất từ lá nhội

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng flavonoid từ dịch chiết lá nhội được đưa ra tại Hình 7.



Hình 7. *Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng flavonoid từ dịch chiết lá nhội*

Kết quả từ hình 7A cho thấy hàm lượng flavonoid được chiết xuất từ lá nhội bằng ethanol 50% cao nhất (tương ứng 2,55 mg quercetin/g bột lá khô), sau đó là ethanol 60% (2,14 mg quercetin/g bột lá khô) và có sự khác biệt đáng kể so với các nồng độ còn lại ($n = 3$, $p < 0,05$). Nồng độ ethanol đóng vai trò quan trọng quyết định đối với khả năng chiết xuất flavonoid từ dược liệu. Nồng độ ethanol khác nhau làm thay đổi độ phân cực của dung môi, ảnh hưởng đến khả năng chiết xuất hoạt chất từ nguyên liệu. Nồng độ cồn thấp, dung môi hòa tan nhiều tạp chất phân cực. Nồng độ cồn cao, hòa tan nhiều chlorophyll làm dịch chiết có màu xanh ảnh hưởng đến quá trình định lượng. Ethanol 50% là nồng độ thích hợp để chiết xuất flavonoid từ lá cây nhội.

Sau khi chọn được nồng độ dung môi phù hợp, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết xuất đến hàm lượng flavonoid. Hình 7B cho kết quả khi chiết xuất trong 3 giờ thì hàm lượng flavonoid đạt cao nhất (tương ứng 3,73 mg quercetin/g bột lá khô). Trong các thời điểm được khảo sát, hàm lượng flavonoid chiết xuất được từ lá nhội tăng dần và đạt cao nhất tại thời điểm 3 giờ. Sau đó hàm lượng flavonoid giảm dần nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên thời gian chiết xuất quá dài có thể làm phân hủy một số thành phần hoạt chất dẫn đến hàm lượng flavonoid giảm nhẹ. 3 giờ là thời gian phù hợp chiết xuất flavonoid từ lá nhội.

Nhiệt độ sử dụng trong quá trình chiết xuất cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng hoạt chất. Các mức nhiệt độ khảo sát từ 20-80 °C. Hình 7C trình bày hàm lượng flavonoid chiết xuất từ lá nhội ở các mức nhiệt độ khác nhau. Hàm lượng flavonoid tăng dần khi tăng nhiệt độ từ 20- 60 °C, sau đó giảm dần. Ở nhiệt độ 60 °C, hàm lượng flavonoid đạt cao nhất là 3,95 mg quercetin/g bột lá khô, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ đến 80 °C. Điều này có thể được giải thích do nhiệt độ tăng làm tăng chuyển động nhiệt của các phân tử hoạt chất, làm dung môi tăng khả năng thấm qua màng tế bào và tăng khả năng hòa tan hoạt chất. Tuy nhiên khi nhiệt độ tăng quá cao thì lượng dung môi bị bay hơi nhiều, đồng thời một phần hoạt chất bị phân hủy bởi nhiệt làm giảm hiệu suất chiết xuất. Như vậy 60 °C là nhiệt độ chiết xuất phù hợp.

Tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi là yếu tố quan trọng khác cần được cân nhắc trong quá trình chiết xuất dược liệu. Tiến hành khảo sát với lượng dung môi gấp 5 đến 60 lần lượng bột lá nhội, kết quả từ hình 7D cho thấy hàm lượng flavonoid chiết xuất được tăng dần và đạt cao nhất ở lượng dung môi gấp 30 lần so với lượng dược liệu. Tỉ lệ 1 : 30 và 1 : 40 cho kết quả hàm lượng flavonoid chiết được khác biệt không có ý nghĩa thống kê, lần lượt tương ứng 4,04 mg quercetin/g bột lá khô và 3,76 mg quercetin/g bột lá khô. Thông thường, khi thể tích dung môi tăng thì sẽ hòa tan được nhiều hoạt chất làm hàm lượng chất chiết xuất được cao hơn. Tuy nhiên khi thể tích dung môi quá nhiều dẫn đến tình trạng bão hòa, tiêu tốn nhiều dung môi. Vì vậy, tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi 1 : 30 g/mL được chọn để chiết xuất flavonoid từ lá nhội.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đặc điểm vi phẫu lá nhội tươi và soi bột lá nhội phát hiện được các thành phần cấu tử đặc trưng của lá. Dựa vào phản ứng hóa học, sơ bộ xác định được trong dịch chiết lá nhội chứa các nhóm hợp chất anthranoid, flavonoid, polyphenol, tannin, steroid, protein và carbohydrat, đặc biệt polyphenol và flavonoid có hàm lượng cao. Thực hiện khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid, xác định được điều kiện phù hợp để chiết xuất flavonoid từ lá cây nhội bao gồm dung môi chiết xuất ethanol 50%, thời gian chiết xuất 3 giờ, nhiệt độ 60 °C và tỉ lệ nguyên liệu/ dung môi 1 : 30 g/mL. Kết quả nghiên cứu là nguồn thông tin quan trọng giúp nhận biết, góp phần vào công tác tiêu chuẩn hóa và phát triển thuốc mới từ nguồn dược liệu có sẵn tại địa phương.

LỜI CẢM ƠN

Kinh phí được hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ cấp trường của trường Đại học Yersin Đà Lạt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. R. Chowdhury, K. H. Chowdhury, and N. B. Hanif, "An integrated exploration of pharmacological potencies of *Bischofia javanica* (Blume) leaves through experimental and computational modeling," *Heliyon*, vol. 6, pp. 1-12, 2020.

[2]. Do Tat Loi, *Vietnamese medicinal plants and herbs*, Hanoi: Medical Publishing House, 2006 (in Vietnamese).

[3]. S. Lingadurai, S. Roy, R. V. Joseph, and L. Nath, "Antileukemic activity of the leaf extract of *Bischofia javanica* Blume on human leukemic cell lines," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 43, no. 2, pp. 143-149, 2011.

[4]. S. Lee, Ha J., Park J., et al, "Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Bischofia javanica* (Blume) Leaf Methanol Extracts through the Regulation of Nrf2 and TAK1," *Antioxidants*, vol. 10, pp. 1295-1312, 2021.

[5]. S. Majeed, "Evaluation of antidiabetic activity of ethanolic extract of *Bischofia javanica* Blume bark by alloxan induced diabetic model," *International Journal of Current Research*, vol. 10, no. 2, pp. 993-999, 2019.

[6]. S. Ilyas, S. Hutahaean, R. S. H. Sinaga, and P. C. Situmorang, "Effect of sikkam (*Bischofia javanica* Blume) ethanolic extract on the quality and quantity of hyperglycemic rat sperm," *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 10, no. 2, pp. 270-278, 2022.

[7]. C. G. P. Rumahorbo, S. Hutahaean, and S. Ilyas, "Insulin expression and insulitis degree of diabetic rats after giving sikkam leaves (*Bischofia javanica* Blume)," *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 9, no. 5, pp. 598-608, 2021.

[8]. R. K. M. Ati1, E. Julianti, and Z. Lubis, "Phytochemical screening and antioxidant activities of ethanol extract and ethyl acetic extract of "sikam's" barks (*Bischofia javanica* BL)", *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science,* vol. 782, 2021.

[9]. M. Sarmah, N. Kashyap, D. Sonowal, and P. Chakravarty, "Screening of bioactive compounds and antimicrobial properties from plant extracts of *Bischofia javanica"*, *International research journal on advanced science hub*, vol. 2, no. 8, pp. 256-260, 2020.

[10]. N. T. Mai, "An initial study on chemical constituents of *Bischofia javanica," Journal of Science and Technology,* vol. 55, no. 2, pp. 188-194, 2017.

[11]. N. T. Mai, "Phenolic compounds isolated from the leaves of Bishop wood *Bischofia javanica* (Blume)," *Vietnam Journal of Chemistry*, vol. 1, no. 55, pp. 91-95, 2017.

[12]. R. K. Al-Ishaq, M. Abotaleb, P. Kubatka, K. Kajo, and D. Büsselberg, "Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels," *Biomolecules*, vol. 9, no. 9, pp. 430-437, 2019.

[13]. J. Xiao, "Recent advances in dietary flavonoids for management of type 2 diabetes," *Current Opinion in Food Science*, Vol. 44, pp. 806-812, 2022.

[14]. T. Hung, and T. T. V. Anh, *Pharmaceutical Practice Curriculum*, Hanoi: Medical Publishing House, 2022 (in Vietnamese).

[15]. Pharmacopoeia Council, *Vietnam Pharmacopoeia V,* vol. 2, Hanoi: Medical Publishing House, 2017 (in Vietnamese).

[16]. C. Chang, M. Yang, H. Wen, and J. Chem, "Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods," *Journal of Food and Drug Analisis*, vol. 10, no. 3, pp. 178-182, 2022.

[17]. D. R. Chhetri, A. M. K. Acharya, and M. Pradhan, "Nutraceutical potential of two edible wild fruits, *Bischofia javanica* Blume and *Ficus cunia* Buch -Ham. ex Roxb. from Sikkim Himalaya," *International Journal of Food Science and Nutrition*, vol.2, no.6, pp. 1-9. 2017.

[18]. P. P. Rajbongshi, K. Zaman, S. Boruah, and S. Das, "A review on traditional use and phytopharmacological potential of *Bischofia javanica* Blume," *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 24, no. 2, pp. 24-29, 2013.

Studying microscopic characteristics and examination of the factors effect flavonoid contents extracted from Bishop wood (*Bischofia javanica* Blume) leaves at Lam Dong province

Tran Mong To Tam[1†] Dinh Thi Thanh Vy, Huynh Hoang Duy, Do Thi Thuy Trang, Huynh Thi Tu Anh, Le Thi Ai Vy, Truong Tuan Khai[1], Lai Loc Hung Phat[1]

[1]*Faculty of Pharmacy and Nursing, Yersin Da Lat University, Lam Dong, Vietnam*

[2]*Center of Experiment and Practice, Yersin Da Lat University, Lam Dong, Vietnam*

[3]*Faculty of Biology and Environment, Yersin Da Lat University, Lam Dong, Viet nam*

Abstract

In recent years, the use of natural herbal remedies in disease treatment in Vietnam has been significantly considered. Research on the chemical composition, microscopic characteristics, and extraction of active components from herbal materials play an important role in medicinal applications. This study aims to describe the microscopic features of fresh Bishopwood leaves using a dual staining method, examine leaf powder under a microscope, determine the components using chemical reactions, and investigate the influence of factors such as ethanol concentration, time, temperature, and the ratio of raw materials to solvents on the process of extracting flavonoids from Bishopwood leaves. Through unique chemical reactions, the components of Bishopwood leaves were identified to include flavonoids, phenolics, tannins, steroids, proteins, carbohydrates, and anthranoids. Microscopic examination of fresh Bishopwood leaves and leaf powder under a microscope revealed characteristic structural components including epidermis, stomata, parenchyma, sclerenchyma, fiber bundles, and vascular bundles. The appropriate conditions for extracting flavonoids from Bishopwood leaves were using 50% ethanol as the extraction solvent, a 3-hour extraction time, a temperature of 60 °C, and a raw material-to-solvent ratio of 1 : 30 (g/mL). The research findings serve as valuable information contributing to the identification, standardization, and development of new drugs from local medicinal materials.

Keywords: *Bishop wood leaves, Bischofia javanica Blume, chemical compositions, microscopic characteristics, flavonoid.*