

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOLS VÀ FLAVONOIDS THU ĐƯỢC TRONG DỊCH CHIẾT LÁ CÂY *Costus pictus* D. Don TRỒNG TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Đào Thanh Hương*, Hồ Thị Nguyệt, Trương Minh Ngọc

Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP. Hồ Chí Minh

*Email: ngdthanhuong2312@gmail.com

Ngày nhận bài: 24/5/2022; Ngày chấp nhận đăng: 25/7/2022

TÓM TẮT

Costus pictus là loài dược liệu có nhiều tác dụng trong y học như kháng oxy hóa, kháng ung thư, kháng khuẩn, kháng viêm và chống tiểu đường, v.v. *C. pictus* đã từng được sử dụng điều trị một số bệnh trong y học cổ truyền Ayurveda của Ấn Độ. *C. pictus* mới được du nhập vào Việt Nam trong một vài năm trở lại đây và chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá hàm lượng hoạt chất sinh học và các tác dụng điều trị bệnh của nó trong điều kiện trồng tại Việt Nam. Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện chiết xuất đến hàm lượng polyphenols và flavonoids trong dịch chiết lá cây *C. pictus*. Kết quả chúng tôi thu nhận được hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần cao nhất theo tính toán lý thuyết trong dịch chiết lá *C. pictus* bằng phương pháp ngâm trong dung môi với các điều kiện như sau: dung môi chiết là ethanol 90%; tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1:50 (g/mL), thời gian chiết 48 giờ. Ở các điều kiện này, hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần tương ứng đạt $94,66 \pm 0,85$ mg GA/g khối lượng khô và $38,49 \pm 0,25$ mg QE/g khối lượng khô.

Từ khóa: *Costus pictus*, polyphenols, flavonoids, điều kiện chiết.

1. MỞ ĐẦU

Polyphenols và flavonoids là những nhóm hợp chất thứ cấp xuất hiện phổ biến trong thực vật không những có vai trò rất quan trọng đời sống sinh lý của cây mà còn có giá trị cao đối với sức khỏe của con người. Polyphenols và flavonoids là những nhóm có hợp chất lớn có chứa vòng phenol trong cấu tạo hạt nhân do đó tạo nên nhiều hoạt tính sinh học đáng quý như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, chống ung thư, chống lão hóa...đặc biệt, polyphenols và flavonoids có khả năng kiểm soát và ức chế bệnh đái tháo đường [1]. Nhiều nghiên cứu cho thấy polyphenols và flavonoids có khả năng kháng bệnh tiểu đường thông qua hỗ trợ điều hòa tiêu hóa carbohydrate, kích thích các thụ thể insulin, kích thích tiết insulin, tăng cường hấp thu glucose ở thành ruột [2-5]. Bên cạnh đó, flavonoids và polyphenols còn có khả năng liên kết hoặc ức chế một số enzyme thủy phân như α -amylase và α -glucosidase giúp làm giảm mức độ đường trong máu [6-9]. Các flavonoids như rutin, kaempferol và quercetin ức chế tiêu hóa và hấp thu carbohydrate trong các nghiên cứu thực nghiệm. Rutin ức chế hoạt động của α -glucosidase trong ống nghiệm bằng cách liên kết trực tiếp với enzyme α -glucosidase thông qua liên kết kỵ nước [10].

Costus pictus D. Don là một cây dược liệu thuộc họ Mía Dò Costaceae thường được tìm thấy ở các khu vực nhiệt đới trên thế giới [11]. *C. pictus* được báo cáo là có khả năng chữa các chứng khó tiêu, sốt, ho, tiêu chảy, đau đầu, nôn mửa, các chứng hô hấp hay thấp khớp [10, 11].

Các nghiên cứu về hợp chất sinh học cho thấy *C. pictus* có chứa nhiều nhóm hợp chất sinh học quan trọng như flavonoids, phenolic, tannin, saponin, sterol và một số khoáng vi lượng như K, Ca, Cr, Mn, Cu, Zn có tác dụng hạ đường huyết, kháng khuẩn, kháng oxy hóa, kháng viêm, chống ung thư [10, 11]. Lá của *C. pictus* đã được báo cáo là có khả năng chống bệnh đái tháo đường rất hiệu quả và đã có một số thí nghiệm điều trị tiểu đường được thử nghiệm trên chuột [14]. Hiện nay, *C. pictus* đã được sử dụng như một nguồn dược liệu chữa trị tiểu đường tại một số bang của Ấn Độ [12, 13]. *C. pictus* ngày càng được quan tâm hơn bởi tác dụng kháng đái tháo đường mạnh mẽ của nó, đã có khá nhiều các nghiên cứu đánh giá thành phần hóa học và cơ chế chống tiểu đường của *C. pictus*, tuy nhiên, không có nhiều các nghiên cứu tập trung vào điều kiện chiết xuất được thực hiện. Cây *C. pictus* mới được du nhập vào Việt Nam vài năm trở lại đây và chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá hiệu quả chiết xuất và tác dụng chống bệnh tiểu đường trong điều kiện trồng tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm kiểm tra sơ bộ thành phần hoạt chất sinh học hiện diện trong lá cây *C. pictus* trồng tại Đồng Tháp, Việt Nam. Bên cạnh đó, nghiên cứu của chúng tôi cũng đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện chiết xuất đến hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần trong dịch chiết lá cây *C. pictus* làm nguyên liệu cho các nghiên cứu đánh giá khả năng kiểm soát và ức chế đái tháo đường trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu và hóa chất thí nghiệm

Lá cây *C. pictus* 6 tháng tuổi được thu thập vào tháng 1 năm 2022 tại Đồng Tháp. Nguyên liệu được rửa sạch, thái nhỏ và phơi khô trong bóng râm ở điều kiện nhiệt độ phòng cho đến khi độ ẩm đạt khoảng 5%, lá thái nhỏ được đóng gói chân không và bảo quản ở nhiệt độ 5-7 °C. Sau đó, lá được xay nhuyễn bằng máy xay bột dược liệu (Supper blender, QE500, Trung Quốc), sàng qua rây có mắt lưới kích thước 1 mm để thu được mẫu có kích thước đồng nhất (Hình 1).

Hóa chất nghiên cứu: Acid gallic chuẩn (98%) và quercetine chuẩn (98%) của hãng Sigma. $AlCl_3$, CH_3COOK , Na_2CO_3 , thuốc thử Folin-Ciocalteu, Ethanol, Methanol được mua từ hãng Himedia (Ấn Độ). Tất cả hóa chất đều đạt chuẩn phân tích.



Hình 1. Bột lá cây *C. pictus* đã được nghiền nhỏ

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện chiết đến khả năng thu nhận polyphenols và flavonoids tổng từ lá cây *C. pictus*

Các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện chiết đến khả năng thu nhận polyphenols toàn phần (TPC) và flavonoids toàn phần (TFC) từ bột lá *C. pictus* được thực hiện theo phương pháp ngâm chiết dung môi. Bình hỗn hợp dung môi được đặt trên máy lắc

ở 90 vòng/phút và trong nhiệt độ phòng (27 ± 2 °C), thiết kế khảo sát đơn yếu tố được thực hiện bao gồm: loại và nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi và thời gian ngâm chiết.

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ dung môi đến khả năng thu nhận hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần từ lá cây Costus pictus

5 g bột lá được cho vào 50 mL dung môi nước; methanol và ethanol ở các nồng độ 50%; 70% và 90%; với tỷ lệ 1:10 g/mL, hỗn hợp được ngâm 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman có kích thước lỗ lọc 13 μ m, phân bã được loại bỏ, phần dịch được sử dụng để đo hàm lượng TPC và TFC.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu: dung môi đến khả năng thu nhận hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần từ lá cây Costus pictus

5 g bột lá được ngâm vào dung môi ethanol 90% theo các tỷ lệ 1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:50 và 1:60 g/mL, hỗn hợp được ngâm trong 24 giờ. Dịch chiết được lọc bằng giấy lọc whatman, phân bã được loại bỏ và phần dịch được sử dụng để đo hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần thu được.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngâm đến khả năng thu nhận hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần từ lá cây Costus pictus

5 g bột lá được cho vào erlen 250 mL và dung môi ethanol 90% được bổ sung theo tỷ lệ 1:50 g/mL. Bình hỗn hợp bột lá và ethanol được ngâm trong các thời gian 24; 48; 72 và 96 giờ. Sau đó, dịch chiết được lọc bỏ bã, phần dịch được thu nhận để định lượng hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần trong dịch chiết.

2.2.2. Phương pháp định tính các nhóm hợp chất trong dịch chiết

Các phương pháp định tính một số hợp chất sinh học trong dịch chiết được thực hiện theo mô tả của Ramya và Dramothadan (2015) [16] và được tóm lược trong Bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp định tính các nhóm hoạt chất sinh học

Nhóm hoạt chất	Phương pháp thực hiện	Dấu hiệu nhận biết
Saponin	2 mL dịch chiết + 2 mL nước cất, lắc mạnh trong 15 phút	Xuất hiện lớp bọt dày khoảng 1 cm
Flavonoids	2 mL dịch chiết + 1 mL NaOH 2N	Màu vàng
Phenolic	1 mL dịch chiết + 2 mL nước cất + vài giọt FeCl ₃ 10%.	Màu xanh lam hoặc xanh lá cây
Alkaloids	2 mL dịch chiết + 2 mL HCl + 2-3 giọt thuốc thử Mayer	Xuất hiện màu xanh lục hoặc kết tủa trắng
Terpenoids	0,5 mL dịch chiết + 2,5 mL chloroform trong H ₂ SO ₄ đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ gạch trên bề mặt
Tannins	1 mL dịch chiết + 1 mL FeCl ₃ 5%	Màu xanh đậm hoặc xanh lục đen

Chỉ tiêu đánh giá: Quan sát hiện tượng màu sắc/hiện tượng trước và sau phản ứng để ghi nhận có hoặc không có các hợp chất tự nhiên trong dịch chiết.

2.2.3. Định lượng flavonoids toàn phần (FTC)

Hàm lượng flavonoids toàn phần được xác định bằng phương pháp tạo màu với AlCl₃ trong môi trường kiềm được mô tả theo Ramya và Dramothadan (2012) [16] có một số điều chỉnh. Hàm lượng flavonoids được xác định trên đường chuẩn quercetin đã biết. Phương pháp dựng đường chuẩn như sau: hút 0,5 mL dung dịch quercetine được pha trong DMSO (nồng độ 20; 40; 60; 80 và 100 μ g/mL) và bổ sung 1,5 mL methanol và chờ trong 5 phút. Sau đó, cho thêm tiếp 0,1 mL AlCl₃ 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm 0,1 mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Sau 45 phút, tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ Genesys 50 -Thermo USA ở bước sóng 415 nm. Dịch chiết lá *C. pictus* được thực hiện tương tự và nồng độ của flavonoid trong các mẫu thí nghiệm được tính toán và biểu thị bằng mg QE/g khối lượng khô. Đường chuẩn Quercetin được biểu diễn dưới dạng $y = 0,0067x - 0,0037$ với $R^2 = 0,9999$.

2.2.4. Định lượng hàm lượng polyphenols toàn phần (TPC)

Hàm lượng polyphenols toàn phần (TPC) được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu [17] có một số điều chỉnh. Hàm lượng phenol toàn phần trong dịch chiết được xác định dựa trên đường chuẩn của gallic acid. Phương pháp dựng đường chuẩn thực hiện như sau: hút lần lượt 1 mL dung dịch gallic acid (nồng độ 10; 20; 30; 40; 50 $\mu\text{g/mL}$) cho vào ống nghiệm có 5 mL dung dịch Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút; sau đó cho thêm 4 mL Na_2CO_3 7,5%. Hỗn hợp được lắc đều bằng máy Vortex, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối trong thời gian 60 phút. Hỗn hợp được đo ở bước sóng 765 nm trên máy quang phổ Genesys 50 -Thermo USA. Các mẫu dịch chiết được tiến hành tương tự với chất chuẩn. Hàm lượng phenol trong mẫu được tính dựa trên đường chuẩn gallic và biểu thị bằng mg GAE/g khối lượng khô. Đường chuẩn gallic acid được biểu hiện dưới dạng $y = 0,0129x + 0,0548$ với $R^2 = 0,9992$.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, kết quả được biểu diễn dưới dạng số trung bình \pm SD. Các số liệu liên quan đến định lượng hoạt chất trong dịch chiết được xử lý phân tích hồi quy, đưa ra hệ số tương quan bằng cách sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính. Số liệu thu nhận được xử lý và tính toán trên phần mềm Excel, phân tích số liệu ANOVA (one-way analysis of variance) và so sánh thống kê dữ liệu bằng phần mềm Minitab 18. Kiểm định Turkey được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $P < 0.05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định tính một số hợp chất tự nhiên có trong dịch chiết lá *Costus pictus*

Bảng kết quả định tính sơ bộ một số hợp chất sinh học (Bảng 2) cho thấy trong lá cây insulin trồng tại Đồng Tháp - Việt Nam có sự hiện diện của các nhóm hợp chất sinh học chính như saponin, flavonoids, polyphenol, terpene, tanins trong tất cả các dịch chiết thu được từ các dung môi nước, methanol và ethanol có nồng độ khác nhau.

Bảng 2. Kết quả định tính một số nhóm hợp chất tự nhiên trong dịch chiết lá *C. pictus*

Thử nghiệm	Nước	Methanol 50%	Methanol 70%	Methanol 90%	Ethanol 50%	Ethanol 70%	Ethanol 90%
Saponin	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+	+	+	+
Polyphenol	+	+	+	+	+	+	+
Alkaloids	+	+	+	+	+	+	+
Terpenoids	+	+	+	+	+	+	+
Tannins	+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+) có sự hiện diện, (-) không có sự hiện diện

3.2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ dung môi chiết xuất đến khả năng ly trích và thu nhận polyphenols và flavonoids từ lá *C. pictus*

Kết quả ảnh hưởng của loại và dung môi chiết xuất đến hàm lượng polyphenols và flavonoids được thể hiện ở Bảng 3. Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoids thu nhận được cao nhất là ở nghiệm thức chiết xuất với methanol 90% (13,33 mg QE/g), tiếp theo là trong ethanol 90% (12,99 mg QE/g) nhưng không có khác biệt về mặt thống kê, và hàm lượng flavonoids thu được trong nghiệm thức sử dụng nước là thấp nhất (tương đương 1,08 mg QE/g) có khác biệt về mặt thống kê với các nghiệm thức sử dụng các dung môi khác (Bảng 3). Hàm lượng polyphenols thu được không có sự khác biệt giữa 2 loại dung môi là ethanol và methanol, tuy nhiên, hàm lượng polyphenols tăng dần từ nồng độ dung môi ethanol/methanol 50% đến 70% (tương đương 10,54 và 10,03 đến 13,53 và 13,88 mg GAE/g), sau đó giảm ở các nghiệm thức chiết xuất với dung môi ethanol/methanol 90%. Hàm lượng polyphenols thấp nhất thu được trong nghiệm thức sử dụng dung môi là nước. Kết quả này có sự tương đồng với kết quả lựa chọn dung môi chiết xuất polyphenols và flavonoids từ cây *C. pictus* của tác giả Naik và cộng sự [18].

Bảng 3. Hàm lượng flavonoids và polyphenols thu nhận được từ các dung môi ly trích khác nhau

Dung môi	Hàm lượng Flavonoids toàn phần (mg QE/g khối lượng khô)	Hàm lượng Polyphenols toàn phần (mg GAE/g khối lượng khô)
Ethanol 50%	04,22 ^d ± 0,06	10,54 ^c ± 0,34
Ethanol 70%	06,60 ^c ± 0,48	13,53 ^a ± 0,28
Ethanol 90%	12,99 ^a ± 0,01	12,25 ^b ± 0,39
Methanol 50%	04,35 ^d ± 0,29	10,03 ^c ± 0,51
Methanol 70%	06,88 ^c ± 0,22	13,88 ^a ± 0,55
Methanol 90%	13,33 ^a ± 0,39	12,66 ^b ± 0,31
Nước	01,08 ^e ± 0,04	03,77 ^d ± 0,14

(^{a,b,c...}: Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)

Việc lựa chọn dung môi chiết xuất phụ thuộc vào loại, bộ phận thực vật và bản chất các hợp chất sinh học mục tiêu cần chiết xuất [19]. Các dung môi khác nhau có độ phân cực và hằng số điện phân khác nhau nên có ái lực liên kết với các hợp chất khác nhau. Trong đó, các dung môi phân cực như methanol, ethanol hay hỗn hợp methanol/ethanol và nước sẽ có độ phân cực khác nhau, do đó khả năng lôi kéo và hòa tan các nhóm chất flavonoids và polyphenols cũng sẽ có sự khác nhau [20]. Khả năng hòa tan các hợp chất polyphenols chủ yếu phụ thuộc vào sự hiện diện và vị trí của các nhóm -OH, kích thước phân tử và chiều dài của chuỗi carbon cấu thành [21]. Do đó, các hợp chất polyphenols thường được chiết xuất trong các dung môi phân cực, tuy nhiên, Medina-Torres cho rằng dung môi có độ tinh khiết quá cao có thể làm biến tính các protein tế bào làm giảm hiệu quả chiết xuất polyphenols trong tế bào [22]. Kết quả này cho thấy các dung môi ethanol và methanol phù hợp với việc tách chiết và thu nhận polyphenols và flavonoids. Tuy nhiên, ethanol an toàn và có chi phí rẻ hơn methanol, do đó, chúng tôi chọn ethanol làm dung môi cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần thu nhận được

Kết quả của thí nghiệm ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng polyphenols và flavonoids được thể hiện ở Bảng 4. Kết quả thí nghiệm cho thấy hàm lượng polyphenols và flavonoids ly trích được tăng dần tỷ lệ thuận với thể tích dung môi sử dụng ly trích. Hàm lượng flavonoids và polyphenols tăng nhanh khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi giảm từ 1:20 xuống 1:30 (g/mL) và hàm lượng hoạt chất tăng nhẹ khi giảm tỷ lệ từ 1:30

xuống 1:50 g/mL. Hàm lượng polyphenols và flavonoids đạt cao nhất trong nghiệm thức có tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:50 g/mL (tương đương 62,59 mg GAE/g và 24,16 mg QE/g), sau đó hàm lượng flavonoids và polyphenols có sự giảm nhẹ khi tăng thể tích dung môi từ 50 mL lên 60 mL trong các nghiệm thức ly trích với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:50 và 1:60 g/mL.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên hàm lượng polyphenols và flavonoids thu nhận được từ lá cây *C. pictus*

Tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi (g/mL)	Hàm lượng polyphenols toàn phần (mg GAE/g khối lượng khô)	Hàm lượng Flavonoids toàn phần (mg QE/g khối lượng khô)
1:10	18,80 ^d ± 0,14	12,71 ^e ± 0,41
1:20	39,16 ^c ± 0,98	17,15 ^d ± 0,63
1:30	51,42 ^b ± 3,26	20,04 ^c ± 0,72
1:40	58,80 ^a ± 1,23	21,90 ^b ± 0,14
1:50	62,59 ^a ± 0,35	24,16 ^a ± 0,86
1:60	62,41 ^a ± 0,63	23,87 ^a ± 0,43

(^{a,b,c...}: Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng đến khả năng hòa tan các hợp chất thứ cấp và đẩy nhanh quá trình khuếch tán hoạt chất sau khi phá vỡ tế bào. Khi tăng thể tích dung môi tách chiết thì sự chênh lệch gradient nồng độ trong môi trường càng lớn, giúp sự khuếch tán của các chất trong dung môi nhanh chóng và hiệu quả hơn. Do đó, ở các nghiệm thức thí nghiệm với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thấp thì lượng dung môi không đủ để hòa tan và ly trích hết polyphenols và flavonoids ra khỏi tế bào nên hàm lượng hoạt chất thu được thấp hơn so với các nghiệm thức có tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lớn. Tuy nhiên, khi tỷ lệ thể tích dung môi và khối lượng nguyên liệu đạt đến trạng thái cân bằng thì hiệu quả chiết xuất không tăng thêm [23]. Hiện tượng hàm lượng polyphenols và flavonoids thu được tăng mạnh khi tăng thể tích dung môi chiết cũng được ghi nhận khi ly trích polyphenols và flavonoids từ *Aquilaria crassna* [24]; vỏ của một số loại trái cây [23].

3.4. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến khả năng thu nhận hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần

Thời gian ngâm chiết có ảnh hưởng đến lớn đến hiệu suất ly trích và chất lượng hoạt chất sinh học cũng như hiệu quả kinh tế. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian chiết lên hàm lượng polyphenols và flavonoids (Bảng 5) cho thấy hàm lượng polyphenols và flavonoids thu được ở các mốc thời gian khác nhau có sự khác nhau. Hàm lượng polyphenols và flavonoids thu được gia tăng theo thời gian từ 24 giờ lên 48 giờ và đạt nồng độ cao nhất tại thời điểm 48 giờ (tương đương 94,66 mg GAE/g và 38,49 mg QE/g), sau đó hàm lượng polyphenols và flavonoids giảm xuống và giữ ổn định sau 72 giờ và 96 giờ.

Theo định luật 2 về khuếch tán của Fick cho thấy khi tăng thời gian chiết xuất thì nồng độ chất tan từ chất nền có thể khuếch tán ra ngoài càng cao, tuy nhiên, khi nồng độ chất tan trong dung môi đạt được trạng thái cân bằng thì tốc độ chiết hoạt chất sinh học trong nguyên liệu chậm lại và không có sự thay đổi đáng kể. Tốc độ và thời gian chiết hoạt chất sinh học trong dung môi sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như trạng thái nguyên liệu, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, nhiệt độ, các hoạt chất cần tách chiết [25]. Bên cạnh đó, khi chiết xuất trong thời gian dài các hợp chất phenolic dễ bị oxy hóa bởi các yếu tố ngoài môi trường như ánh sáng,

nhiệt độ, nồng độ oxy... dẫn đến làm giảm hàm lượng và chất lượng hoạt chất sinh học thu được trong chiết xuất [26].

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết lên hàm lượng polyphenols và flavonoids thu nhận được

Thời gian ngâm	Hàm lượng polyphenols toàn phần (mg GAE/g khối lượng khô)	Hàm lượng flavonoids (mg QE/g khối lượng khô)
24 giờ	62,59 ^c ± 0,35	24,16 ^c ± 0,88
48 giờ	94,66 ^a ± 0,85	38,49 ^a ± 0,25
72 giờ	64,33 ^b ± 0,32	30,51 ^b ± 1,44
96 giờ	64,62 ^b ± 0,17	30,13 ^b ± 0,58

(^{a,b,c...}: Các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)

Khi so sánh với các nghiên cứu khác, hàm lượng polyphenols thu nhận được trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương hoặc cao hơn hàm lượng polyphenols trong nghiên cứu của Santhosh (2019) [15] và Naik và cộng sự (2017) [18]. Tuy nhiên, hàm lượng flavonoids thu được trong nghiên cứu của chúng tôi lại thấp hơn trong nghiên cứu của Naik và cộng sự (2017) [18] và Aruna và cộng sự (2014) [27]. Điều này có thể được giải thích do sự tương quan của một số các yếu tố sinh lý của cây tại thời điểm thu hoạch như tuổi cây, thời gian thu hái lá, điều kiện sinh trưởng-phát triển của cây khác nhau dẫn đến hàm lượng hoạt chất thu được có sự khác biệt. Bên cạnh đó, các điều kiện chiết xuất khác nhau cũng ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenols và flavonoids thu nhận được.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được một số điều kiện thích hợp cho việc chiết xuất polyphenols và flavonoids từ lá *Costus pictus* như sau: phương pháp được sử dụng là phương pháp ngâm chiết với ethanol 90%, tỷ lệ nguyên liệu : dung môi (1:50 mg/mL), thời gian ngâm là 48 giờ và hàm lượng polyphenols và flavonoids toàn phần thu được tương đương 94,66 mg GAE/g khối lượng khô và 38,49 mg QE/g khối lượng khô.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này là một phần nội dung trong đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ “Nghiên cứu công nghệ sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ kiểm soát đường huyết từ dịch chiết lá cây insulin Ấn Độ (*Costus pictus*) trồng tại Việt Nam” theo Hợp đồng số 08/2022/HĐ-ĐTCB. Chúng tôi chân thành cảm ơn Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP.HCM đã tài trợ kinh phí và tạo điều kiện cho chúng tôi nghiên cứu đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bacanlia M., Dilsiza S.A., Başarana N., and Başaran A.A. - Chapter five - Effects of phytochemicals against diabetes, *Advances in Food and Nutrition Research* **89** (2019) 209-238.
2. Ross J. A. and Kasum C. M. - Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annual Review of Nutrition* **22** (2002) 19-34.
3. AL-Ishaq R.K., Abotaleb M., Kubatka P., Kajo K., and Büsselberg D. - Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels, *Biomolecules* **9** (430) (2019) 1–35. doi: 10.3390/biom9090430
4. Kumar S. and Pandey A.K. - Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview, *The Scientific World Journal* **2013** (2013) 162750.
5. Guasch-Ferré M., Merino J., Sun Q., Fitó M., & Salas-Salvadó J. - Dietary polyphenols, mediterranean diet, prediabetes, and type 2 diabetes: A narrative review of the evidence, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017** (2017) 6723931.

6. Sun L., Wang Y., and Miao M. - Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: Substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention, *Trends in Food Science and Technology* **104** (2020) 190–207. doi: 10.1016/j.tifs.2020.08.003.
7. Li K., Yao F., Xue Q., Fan H., Yang L., Li X., Sun L., Liu Y. - Inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure–activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method, *Chemistry Central Journal* **12** (82) (2018) 1–11. DOI: 10.1186/s13065-018-0445-y
8. Pereira D.F., Cazarolli L.H., Lavado C., Mengatto V., Figueiredo M.S., Guedes A., Pizzolatti M.G., Silva F.R. - Effects of flavonoids on alpha-glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis, *Nutrition* **27** (11-12) (2011) 1161-1167. doi: 10.1016/j.nut.2011.01.008
9. Sales. M.P., Souza P.M., and Silveira D. - Alpha-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **15** (1) (2012) 141-183. DOI:10.18433/J35S3K
10. Li Y.Q., Zhou F.C., Gao F., Bian J. S., & Shan F. - Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57** (24) (2009) 11463-11468. doi:10.1021/jf903083h
11. Selvakumarasamy S., Rengaraju B., Arumugam S. A., and Kulathooran R. - *Costus pictus*–transition from a medicinal plant to functional food: A review, *Future Foods* **4** (7) (2021) 100068. doi: 10.1016/j.fufo.2021.100068.
12. Sulakshana G. and Rani A. - HPLC analysis of diosgenin in three species of *Costus*, *International Journal of Pharma Sciences and Research* **5** (11) (2014) 747–749. <http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR14-05-11-045.pdf>
13. Shiny S.P., Saxena C.T., and Gupta A. - Phytochemical investigation of the insulin plant '*Costus pictus*' D. Don, *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* **4** (2013) 97–104.
14. Rege A., Ambaye R., and Chowdhary A. - Effect of *Costus Pictus* D. Don on carbohydrate hydrolyzing enzymes, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **6** (7) (2014) 278-280.
15. Santosh G.M., Ramesh A.N., Santhosh D.B., and Doss D.D. - Biochemical characterization of active ingredient as an anti-diabetic agent in spotted spiral ginger (*Costus pictus*), *International Journal of Agricultural Science* **11** (3) (2019) 7836-77837.
16. Ramya R., and Dhamotharan R. - Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Costus speciosus*, *International Journal of Health Sciences and Research* **5** (12) (2015) 170-176. DOI:10.13140/RG.2.2.34278.24646
17. Parvathy N.G, Padma R., Renjith V., Kalpana P., Rahate and Saranya T.S. - Phytochemical screening and anthelmintic activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4** (1) (2011) 232–234.
18. Naik A., Krishnamurthy R., and Pathak J. - Antioxidant activity and phytochemical screening of *Costus pictus* D. Don leaf extracts, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **9** (6) (2017) 789-796.
19. Abubakar A.R., and Haque M. - Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **12** (1) (2020) 1-10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
20. Bushra S., Farooq A., and Muhammad A. - Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts, *Molecules* **14** (2009) 2167-2180. DOI: 10.3390/molecules14062167.

21. Iloki-Assanga S.B., Lewis-Luján L.M., Lara-Espinoza C.L., and Al .E. - Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*, BMC Research Notes **8** (396) (2015) 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1388-1>.
22. Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., Sánchez-Contreras A., and Pacheco N. - Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources, Agronomy **7** (3) (2017) 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
23. Predescu N.C., Papuc C., Nicorescu V., Gajaila I.U.L.I A.N.A., Goran G.V., Petcu C.D., & Stefan G. - The influence of solid-to-solvent ratio and extraction method on total phenolic content, flavonoid content and antioxidant properties of some ethanolic plant extracts, Revista de Chimie **67** (10) (2016) 1922-1927.
24. Tay P., Tan C., Abas F., Yim H., and CW H. - Assessment of extraction parameters on antioxidant capacity, polyphenol content, epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG) and iriflophenone 3-C- β -glucoside of agarwood (*Aquilaria crassna*) young leaves, Molecules **19** (8) (2014) 12304-09. doi: 10.3390/molecules190812304
25. Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez H., Rees J.F., and Larondelle, Y. - Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region, Food Chemistry **101** (3) (2007) 1012-1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>
26. Naczki M., and Shahidi F. - Extraction and analysis of phenolics in food, Journal of Chromatography A **1054** (1–2) (2004) 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
27. Aruna A., Nandhini R., Karthikeyan V., Bose P., and Vijayalakshmi K. - Comparative anti-diabetic effect of methanolic extract of insulin plant (*Costus pictus*) leaves and its silver nanoparticle, Indo American Journal of Pharmaceutical Research **4** (7) (2014) 3217-3220.

ABSTRACT

EFFECTS OF EXTRACT CONDITIONS ON POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS FROM THE EXTRACT OF *COSTUS PICTUS* D. DON LEAVES GROWN IN VIETNAM

Nguyen Dao Thanh Huong*, Ho Thi Nguyet, Truong Minh Ngoc
Branch of National Center for Technological Progress in Ho Chi Minh City
*Email: ngdthanhuong2312@gmail.com

Costus pictus of Costaceae has many medicinal effects such as antioxidant, anti-cancer, antibacterial, anti-inflammatory, and anti-diabetic, etc. *C. pictus* was used to treat diabetic diseases in Ayurvedic traditional medicine of India. *C. pictus* has just been planted in Vietnam in the past few years. There have not been many studies screening bioactive ingredients and therapeutic effects in leaves *C. pictus* under growth conditions in Vietnam. The study aimed to investigate the effects of some extraction conditions on the contents of polyphenols and flavonoids in the leaf extracts. As a result, we obtained the highest content of polyphenols and flavonoids according to theoretical calculations in *C. pictus* leaves extract by cold maceration method with the following conditions: extraction solvent is ethanol 90%; material: solvent ratio is 1:50 (g/mL) in 48 hours of extraction time. At these conditions, the measured polyphenols and flavonoids were equivalent to 94.66 ± 0.85 mg GA/g dry weight and 38.49 ± 0.25 mg QE/g dry weight, respectively.

Keywords: *Costus pictus*, polyphenols, flavonoids, extraction conditions.