



TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT FLAVONOID TỪ BÌM BA RĂNG (*MERREMIA TRIDENTATA* L., CONVULVULACEAE)

Optimization of extraction of flavonoid from *Merremia tridentata* L., Convolvulaceae

Nguyễn Việt Cường^{1a}, Võ Văn Lệnh¹, Võ Thị Bạch Huệ²

¹Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng

²Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

^anguyenvietcuong.shin@gmail.com

TÓM TẮT: Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L.) là một cây thuốc dân gian được sử dụng ở nước ta. Bìm ba răng chủ yếu được dùng để điều trị một số bệnh như sốt rét, bệnh dờ leo, viêm nhiễm ngoài da. Thành phần hóa học chính là các flavonoid. Nghiên cứu này xây dựng và tối ưu hóa quy trình chiết xuất flavonoid trong Bìm ba răng. Kết quả cho thấy, bột thân và lá Bìm ba răng được chiết với cồn 58,2% với tỷ lệ dung môi/dược liệu là 49,9 ml/g. Quá trình chiết xuất được hỗ trợ bằng sóng siêu âm. Thời gian siêu âm là 22,3 phút. Quy trình chiết xuất cho hàm lượng flavonoid chiết được đại diện là cynarosid cao nhất, 0,406%.

TỪ KHÓA: Bìm ba răng, *Merremia tridentata*, flavonoid.

ABSTRACT: Bim ba rang (*Merremia tridentata* L.) is a traditional medicinal plant used in our country. It is mainly used to treat a number of diseases such as malaria, shingles, skin infections. The main chemical components are flavonoids. This study will establish and optimize the flavonoid extraction process. The results showed that the stem and leaf powder was extracted with 58.2% alcohol with a solvent / medicinal ratio of 49.9 ml/g. The extraction process is assisted by ultrasonic waves. The time for ultrasound is 22.3 minutes. The extraction procedure gave the highest cynarosid content, 0.406%.

KEYWORDS: *Merremia tridentata*, flavonoid, extraction.

1. GIỚI THIỆU

Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L.), còn gọi là Dây lười đòng là một cây thuốc dân gian được sử dụng ở nước ta, phân bố rộng từ Nam Trung Bộ đến Tây Nam Bộ. Bìm ba răng chủ yếu được dùng để điều trị một số bệnh như sốt rét, bệnh dờ leo, viêm nhiễm ngoài da. Thành phần hóa học chính phần cây trên mặt đất của Bìm ba răng là flavonoid, một số hợp chất phenol, saponin,... Các công trình nghiên cứu trên thế giới cho thấy Bìm ba răng có một số tác dụng sinh học như chống oxy hóa, giảm đau, kháng viêm, làm lành vết thương. Các tác dụng này có được chủ yếu là nhờ nhóm flavonoid^[1]. Trong nghiên cứu trước đó của nhóm tác giả đã xác định được một số flavonoid có mặt trong Bìm ba răng như apigenin, luteolin, quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosid (quercitrin), apigenin-7-O- β -D-glucopyranosid (apigetrin), luteolin-7-O- β -D-glycopyranosid (cynarosid), trong đó cynarosid là chất có hàm lượng cao nhất^[2]. Nghiên cứu này xây dựng và tối ưu hóa quy trình chiết xuất flavonoid trong Bìm ba răng với mong muốn thu được lượng cao cồn và hàm lượng cynarosid cao nhất, từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu bào chế tiếp theo.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thân lá Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L.) được thu hái tại xã Ân Hảo Đông, huyện Hoài Ân, tỉnh Bình Định vào tháng 9 năm 2017. Việc định danh loài được thực hiện

tại bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng (tra cứu theo thông tin trong sách Từ điển cây thuốc Việt Nam và sách Từ điển thực vật thông dụng của tác giả Võ Văn Chi)^[3]. Mẫu nghiên cứu hiện được lưu trữ tại bộ môn Hóa phân tích Kiểm nghiệm, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng. Chất đối chiếu cynarosid được nhóm nghiên cứu phân lập được với độ tinh khiết 98,38%. Độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp quy về 100% diện tích pic trên sắc kí đồ sắc kí lỏng hiệu năng cao^[4]. Các dung môi, hóa chất sử dụng đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu 1g bột thân lá Bìm ba răng (kích thước 0,5 - 1,0 mm, độ ẩm 1,26%) được làm ẩm bằng một lượng vừa đủ dung môi, được chiết xuất bằng phương pháp chiết hỗ trợ bằng siêu âm trên bề siêu âm Elmasonic S180H công suất siêu âm 200W. Lượng dung môi chia làm hai, chiết hai lần. Các thông số nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/dược liệu, thời gian siêu âm và nhiệt độ được thay đổi theo thiết kế. Toàn bộ dịch chiết được gộp chung, lọc, cô cách thủy và sấy chân không để thu được cao khô. Cân và tính toán khối lượng cao thu được.

Định lượng cynarosid chiết được: toàn bộ cao khô thu được đem hòa tan trong bình định mức 100 ml với dung môi pha mẫu là hỗn hợp methanol - nước (1:1). Lọc qua

Received: December 19th, 2019

Accepted: April 30th, 2020

*Corresponding Author

Email: nguyenvietcuong.shin@gmail.com

màng lọc 0,45 µm. Mẫu thử được tiêm vào hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 với các điều kiện sắc kí đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH^[5]. Cột sắc kí Phenomenex Luna C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), thể tích tiêm mẫu 10 µl, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò dây diod quang (DAD) với bước sóng phát hiện 350 nm. Pha động bao gồm acetonitril (A) và dung dịch acid phosphoric pH 2,5 (B) với chương trình rửa giải gradient là 0 - 16 phút, 15,5%A; 16 - 25 phút, 20%A; 25 - 26 phút, 15,5%A. Thực hiện song song với mẫu đối chiếu cynarosid có nồng độ khoảng 40 µg/ml. Tính toán hàm lượng (%) cynarosid chiết được từ bột thân lá Bim ba răng.

Các thí nghiệm khảo sát ban đầu được thiết kế bằng phần mềm Modde 5.0 theo mô hình D-optimal với các mức và yêu cầu của 4 biến độc lập và 2 biến phụ thuộc được trình bày trong bảng 1. Thí nghiệm tối ưu hóa được thiết kế theo mô hình Box Behnken. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Quy trình chiết xuất tối ưu được thực nghiệm kiểm chứng lặp lại ba lần. Dùng trắc nghiệm t để so sánh kết quả thực nghiệm với kết quả dự đoán.

Bảng 1. Ý nghĩa và các mức của các biến theo thiết kế.

Biến độc lập	Mức 1	Mức 2	Mức 3
X ₁ - Nồng độ cồn (%)	30	50	70
X ₂ - Tỷ lệ dung môi/dược liệu (ml/g)	10	30	50
X ₃ - Thời gian siêu âm (phút)	5	15	25
X ₄ - Nhiệt độ (°C)	30	50	70
Biến phụ thuộc	Điều kiện ràng buộc		
Y ₁ - tỉ lệ cao cồn chiết được (mg/g)	Tối đa		
Y ₂ - lượng cynarosid chiết được (%)	Tối đa		

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thực hiện 12 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Modde 5.0 nhằm khảo sát sơ bộ ảnh hưởng của các biến độc lập đến tỉ lệ cao cồn chiết được (Y₁) và hàm lượng cynarosid chiết được (Y₂). Kết quả cho thấy nồng độ cồn (X₁), tỷ lệ dung môi/dược liệu (X₂), thời gian siêu âm (X₃) có ảnh hưởng đến tỷ lệ cao cồn và hàm lượng cynarosid chiết được (P < 0,05). Riêng biến nhiệt độ (X₄) ảnh hưởng không đáng kể đến cả hai biến phụ thuộc (P > 0,05). Nghiên cứu loại yếu tố nhiệt độ ra khỏi thí nghiệm.

Thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất được thiết kế theo mô hình Box-Behnken với 3 yếu tố, mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần. Kết quả các thí nghiệm được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả các thí nghiệm tối ưu hóa.

TT	Mã TN	X ₁ (%)	X ₂ (ml/g)	X ₃ (phút)	Y ₁ (mg/g)	Y ₂ (%)
1	--0	30	10	15	241,1	0,216
2	+0-	70	10	15	205,7	0,321
3	--0	30	50	15	319,1	0,291

4	++0	70	50	15	295,2	0,413
5	-0-	30	30	5	302,7	0,249
6	+0-	70	30	5	274,7	0,406
7	-0+	30	30	25	301,3	0,278
8	+0+	70	30	25	274,6	0,401
9	0--	50	10	5	253,5	0,316
10	0+-	50	50	5	313,7	0,361
11	0-+	50	10	25	231,9	0,280
12	0++	50	50	25	317,6	0,398
13	000	50	30	15	292	0,381
14	000	50	30	15	294,9	0,380
15	000	50	30	15	291,6	0,393
16	--0	30	10	15	241,7	0,229
17	+0-	70	10	15	217,8	0,325
18	--0	30	50	15	309,9	0,271
19	++0	70	50	15	290,3	0,423
20	-0-	30	30	5	290,8	0,214
21	+0-	70	30	5	265,3	0,391
22	-0+	30	30	25	292,4	0,246
23	+0+	70	30	25	270,1	0,391
24	0--	50	10	5	245,9	0,301
25	0+-	50	50	5	305,1	0,352
26	0-+	50	10	25	234,7	0,313
27	0++	50	50	25	305,9	0,352
28	000	50	30	15	279,5	0,384
29	000	50	30	15	281,6	0,372
30	000	50	30	15	288,7	0,401

Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy cho thấy sự tương quan giữa tỷ lệ cao cồn chiết được (mg/g) và các biến độc lập được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy Y₁ (mg/g) theo các biến độc lập.

	df	SS	MS	F	P
Mô hình (Model)	9	26480,9	2942,3	78,19	0,000
Số dư (Residual)	20	752,6	37,6		
Không phù hợp (Lack of fit)	3	131,7	43,9	1,20	0,339
Sai số thuần (Pure error)	17	620,9	36,5		
Tổng	29	27233,5	939,09		

R² = 0,972; R² hiệu chỉnh = 0,960

Kết quả cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê và có sự tương thích với thực nghiệm. Giá trị p mô hình < 0,05, giá trị p không phù hợp > 0,05. R² hiệu chỉnh = 0,960 ở độ tin cậy 95%. Từ kết quả trên, phân tích ảnh hưởng của các biến độc lập đối với tỷ lệ cao cồn chiết được. Kết quả phân tích ANOVA các hệ số trong phương trình hồi quy được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích ANOVA các hệ số trong phương trình hồi quy của Y₁.

Hệ số	Giá trị SC	Sai số chuẩn	Giá trị P
Hằng số	288,05	2,50429	1,08232x10 ⁻²⁹
C	-12,8313	1,53356	5,78946x10 ⁻⁸
R	36,5313	1,53356	3,74449x10 ⁻¹⁶
T	-1,45	1,53356	0,355681
C ²	-7,50	2,25733	0,0033961
R ²	-15,45	2,25733	1,18769x10 ⁻⁶
T ²	3,43751	2,25733	0,143459
CR	1,97498	2,16877	0,373329
CT	0,562498	2,16877	0,798007
RT	4,6875	2,16877	0,0429713

Trong đó: C: Nồng độ cồn (%).
R: tỷ lệ dung môi/được liệu (ml/g).
T: thời gian siêu âm (phút).

Phương trình hồi quy thu được: Y₁ (mg/g) = 288,05 - 12,8313*C + 36,5313*R - 7,50*C² - 15,45*R² + 4,6875*RT. Như vậy, nồng độ cồn và tỷ lệ dung môi/được liệu có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ cao cồn chiết được. Thời gian siêu âm ảnh hưởng không đáng kể nhưng có ảnh hưởng khi xét cùng với tỷ lệ dung môi/được liệu. Dựa trên phương trình hồi quy của mô hình, sử dụng công cụ tối ưu hóa của phần mềm Modde 5.0 cho phép xác định giá trị tỷ lệ cao cồn chiết được mong muốn và các giá trị tương ứng của các yếu tố. Kết quả giá trị tỷ lệ cao cồn tối đa chiết được là 307,75 mg/g khi chiết bằng ethanol 57,7% với tỷ lệ 49,9 ml/g trong 21,8 phút. Lặp lại thí nghiệm theo điều kiện dự đoán 3 lần thu được kết quả tỷ lệ cao cồn chiết được lần lượt là 305,92 mg/g; 307,61 mg/g và 307,03 mg/g. Tỷ lệ cao cồn chiết được thực tế trung bình là 306,85 mg/g khác biệt không có ý nghĩa với tỷ lệ dự đoán 307,75 mg/g.

Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy cho thấy sự tương quan giữa hàm lượng cynarosid chiết được (%) và các biến độc lập được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA của phương trình hồi quy Y₂ (%) theo các biến độc lập.

	df	SS	MS	F	P
Mô hình (Model)	9	0,11489	1,3x10 ⁻²	49,0812	0,000
Số dư (Residual)	20	5,2x10 ⁻⁴	2,6x10 ⁻⁴		

Không phù hợp (Lack of fit)	3	1,3x10 ⁻³	4,2x10 ⁻⁴	1,81876	0,182
Sai số thuần (Pure error)	17	3,9x10 ⁻³	2,3x10 ⁻⁴		
Tổng	29	0,12009	4,1x10 ⁻³		

R² = 0,957; R² hiệu chỉnh = 0,937

Kết quả cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê và có sự tương thích với thực nghiệm. Giá trị p mô hình < 0,05, giá trị p không phù hợp > 0,05. R² hiệu chỉnh = 0,937 ở độ tin cậy 95%. Từ kết quả trên, phân tích ảnh hưởng của các biến độc lập đối với tỷ lệ cao cồn chiết được. Kết quả phân tích ANOVA các hệ số trong phương trình hồi quy được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả phân tích ANOVA các hệ số trong phương trình hồi quy của Y₂.

Hệ số	Giá trị SC	Sai số chuẩn	Giá trị P
Hằng số	0,385167	0,00658389	7,7414x10 ⁻²⁴
C	0,0671875	0,00403179	3,40531x10 ⁻¹³
R	0,035	0,00403179	3,22594x10 ⁻⁸
T	0,00418751	0,00403179	0,311375
C ²	-0,0432084	0,0059364	4,84043x10 ⁻⁷
R ²	-0,0308333	0,0059363	4,39237x10 ⁻⁵
T ²	-0,0202083	0,0059364	0,00280783
CR	0,00912497	0,00570181	0,125196
CT	0,00850001	0,00570181	0,15163
RT	0,007625	0,00570181	0,196137

Trong đó: C: Nồng độ cồn (%).
R: tỷ lệ dung môi/được liệu (ml/g).
T: thời gian siêu âm (phút).

Phương trình hồi quy thu được: Y₂ (%) = 0,385167 + 0,0671875*C + 0,035*R - 0,0432084*C² - 0,0308333*R² - 0,0202083T². Nồng độ cồn và tỷ lệ dung môi/được liệu có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ cao cồn chiết được. Thời gian siêu âm ảnh hưởng không đáng kể nhưng có ảnh hưởng khi xét bình phương thời gian siêu âm. Dựa trên phương trình hồi quy của mô hình, sử dụng công cụ tối ưu hóa của phần mềm Modde 5.0 cho phép xác định giá trị hàm lượng cynarosid chiết được mong muốn và các giá trị tương ứng của các yếu tố. Kết quả giá trị tỷ lệ cao cồn tối đa chiết được là 0,409% khi chiết bằng ethanol 58,2% với tỷ lệ 49,9 ml/g trong 22,3 phút. Lặp lại thí nghiệm theo điều kiện dự đoán 3 lần thu được kết quả hàm lượng cynarosid chiết được lần lượt là 0,412%; 0,401% và 0,405%. Hàm lượng cynarosid chiết được thực tế trung bình là 0,406% khác biệt không có ý nghĩa với tỷ lệ dự đoán 0,409%.

Bìm ba răng là một cây thuốc dân gian quý nhưng chưa có nhiều nghiên cứu. Các nghiên cứu trong nước còn rất hạn chế, chủ yếu là xác định thành phần hóa học có trong

cây, chưa có nghiên cứu nào về việc chiết xuất các nhóm hợp chất. Nghiên cứu này xây dựng và tối ưu hóa quy trình chiết xuất Bìm ba răng với mong muốn thu được lượng cao cồng và hàm lượng flavonoid cao nhất. Nghiên cứu cho thấy điều kiện chiết xuất tối ưu tỷ lệ cao cồng chiết được (chiết bằng ethanol 57,7% với tỷ lệ 49,9 ml/g trong 21,8 phút) so với tối ưu hàm lượng cynarosid chiết được (chiết bằng ethanol 58,2% với tỷ lệ 49,9 ml/g trong 22,3 phút) khác nhau không nhiều. Khi áp dụng quy trình chiết xuất tối ưu đối với hàm lượng cynarosid thu được tỷ lệ cao cồng không khác nhiều so với khi chiết bằng quy trình tối ưu đối với tỷ lệ cao cồng chiết được (302,2 mg/g so với 306,85 mg/g). Việc chiết xuất hi vọng chiết được nhiều nhất có thể các hợp chất quý có tác dụng sinh học đã được chứng minh. Do đó nghiên cứu chọn điều kiện chiết cho hàm lượng cynarosid chiết được làm điều kiện tối ưu để chiết xuất flavonoid trong Bìm ba răng.

4. KẾT LUẬN

Đề tài nghiên cứu đã tìm được quy trình chiết xuất tối ưu đối với Bìm ba răng. Bột thân và lá Bìm ba răng được chiết với cồng 58,2% với tỷ lệ dung môi/dược liệu là 49,9 ml/g. Quá trình chiết xuất được hỗ trợ bằng sóng siêu âm. Thời gian siêu âm là 22,3 phút. Tiến hành chiết xuất hai lần. Toàn bộ dịch chiết được gộp chung, lọc, cô cách thủy và sấy chân không thu được cao khô. Quy trình chiết xuất flavonoid trong thân lá Bìm ba răng được ứng dụng trong các nghiên cứu chiết xuất và bào chế tiếp theo.

5. LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến Trường Đại Học Lạc Hồng đã tạo điều kiện, cung cấp kinh phí, phòng thí nghiệm để thực hiện nghiên cứu này. Cảm ơn ban biên tập và phản biện Tạp chí Khoa học Lạc Hồng (Journal of science of Lac Hong University) đã góp ý cho bài báo này.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. A. Bidkar, A. P. Sherje, K. N. Gujar, U. S. Bagul, P. B. Miniyar, S. A. Aphale, Phytochemical and pharmacological investigation of extracts of *Merremia tridentata* Linn. (Convolvulaceae), *Journal of Natural Remedies*, **2009**, 9(1), 79-84.
- [2] Nguyễn Việt Cường, Võ Văn Lệnh, Võ Thị Bạch Huệ, Chiết xuất phân lập một số flavonoid từ cây Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L. Convolvulaceae), *Tạp chí Dược học*, **2019**, 518, 69-73.
- [3] Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y Học, **2011**, Tập 1.
- [4] Nguyễn Việt Cường, Võ Văn Lệnh, Võ Thị Bạch Huệ, Xây dựng quy trình định lượng một số flavonoid trong cao chiết từ cây Bìm ba răng (*Merremia tridentata* L.) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược học*, **2020**, 525, 46-49.
- [5] ICH harmonised tripartite guideline, *Validation of analytical procedures: Text and methodology*, **2005**.