

ẢNH HƯỞNG MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT FLAVONOID TOÀN PHẦN TỪ HẠT SEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SIÊU ÂM BỂ

Đặng Thanh Long^{1*}, Hoàng Thị Kim Hồng², Lê Lý Thùy Trâm³, Nguyễn Thị Quỳnh Trang⁴, Nguyễn Phan Thủy Tiên²

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

² Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³ Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng

⁴ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Hạt sen đã được chứng minh là có nhiều tính chất dược lý như chất chống oxy hóa, chống viêm, chống mất trí nhớ và hoạt tính chống khối u. Các nhà khoa học cho rằng, các hợp chất có hoạt tính sinh học hoặc tính chất dược lý đóng vai trò quan trọng đã được tìm thấy trong hạt sen có bản chất là alkaloid và flavonoid. Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố: Nồng độ dung môi ethanol, pH dung môi, thời gian siêu âm, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và nhiệt độ siêu âm ảnh hưởng tới quá trình tách chiết flavonoid toàn phần từ trong hạt sen. Kết quả chúng tôi thu được hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất theo tính toán lý thuyết trong dịch chiết từ hạt sen bằng phương pháp siêu âm bể ở thời gian 90 phút; nồng độ dung môi 70%; pH 4; nhiệt độ 50°C và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 25:1.

Từ khóa: Flavonoid, hạt sen, tách chiết, tối ưu, siêu âm bể.

MỞ ĐẦU

Cây sen (*Nelumbo nucifera*) là loài cây thủy sinh lâu năm sống trong các ao hồ, đầm lầy. Từ xa xưa, Cây sen đã trở thành loài cây thân thuộc và gần gũi với người dân Việt Nam cũng như một số nước Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản,... Cây sen không chỉ có ý nghĩa về mặt kinh tế, vật chất mà cả về mặt tinh thần. Tất cả các bộ phận khác nhau của Cây sen đều có thể được sử dụng làm món ăn và vị thuốc có giá trị trong y học cổ truyền (Xie et al., 2013).

Đối với hạt sen, đã có nhiều nghiên cứu khảo sát về mục đích, lợi ích sức khỏe của việc tiêu thụ hạt sen, đặc biệt là trong thập kỷ trước, khi mà mọi người có ý thức hơn về vấn đề bảo vệ sức khỏe của mình thông qua các thực phẩm chức năng (Fazekas et al., 2008). Hạt sen đã được chứng minh là có nhiều tính chất dược lý như chất chống oxy hóa (Xie et al., 2013; Liu et al., 2015), chống viêm (Itoh et al., 2011), chống mất trí nhớ (Liao et al., 2010) và hoạt tính chống khối u (Poornima et al., 2014). Các hợp chất có hoạt tính sinh học hoặc hoạt tính y dược đóng vai trò quan trọng đã được tìm thấy trong hạt sen có bản chất là alkaloid và flavonoid (Liu et al., 2015). Theo nghiên cứu của Jung và đồng tác giả (2010) cho thấy hạt sen giàu flavonoid và alkaloid. Trong số đó, flavonoid là một nhóm lớn có chứa gần 6.000 các hợp chất thứ cấp chuyển hóa thực vật thứ yếu, là số lượng lớn nhất trong các hợp chất phenolic có trong tự nhiên (Paran, Michelmor, 1993). Trong những năm gần đây, flavonoid đã nhận được sự chú ý đáng kể vì sức khỏe của con người trong việc tác dụng ngăn ngừa nhiều bệnh mãn tính, chẳng hạn như bệnh tim mạch, bệnh tiểu đường type II, bệnh thoái hóa thần kinh và các loại ung thư khác nhau (Vijayan, Tsou, 2010). Nghiên cứu flavonoid trong hạt sen được Kredy và đồng tác giả (2010) tiến hành xác định các flavonol trong hạt sen tươi *N. nucifera* Gaertn. (FSENN) và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của chúng (Kredy et al., 2010). Ruvanthika và đồng tác giả (2017) đã tiến hành nghiên cứu sàng lọc, đánh giá và so sánh các hợp chất có chứa trong hạt và vỏ hạt sen *N. nucifera*. Hàm lượng phenolic tổng số có trong vỏ hạt là 93,45 mg Gallic Acid Equivalents và 10,5 mg/g trong hạt, tổng hàm lượng flavonoid là 295,312 mg/g Quercetin trong vỏ hạt và 28,125 mg/g trong hạt, hàm lượng tannin là 508,7 mg/g trong vỏ hạt và 69,637 mg/g trong hạt (Ruvanthika et al., 2017).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu nghiên cứu

Hạt sen trắng (*Nelumbo nucifera*) sử dụng trong nghiên cứu này được thu mua từ người trồng sen ở Nội và Ngoại Thành, Thừa Thiên Huế. Hạt sen được bóc vỏ, rửa sạch trên vòi nước sau đó sấy khô ở 50°C để đạt độ ẩm dưới 10%. Hạt sen sau đó được xay mịn và rây qua rây có kích thước $d = 1$ mm, bột hạt sen tiến hành bảo quản trong túi PE (Polyetylen) đặt trong hộp nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng và ẩm để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bố trí thí nghiệm

Flavonoid toàn phần được chiết tách từ hạt sen (d = 1 mm) bằng phương pháp siêu âm bề trên hệ dung môi ethanol ở các mức 30, 50, 70, và 90% (v/v) với các pH là 3; 4; 5; 6; 7, thời gian siêu âm 30, 60, 90, 120 và 150 phút với tỷ lệ dung môi: nguyên liệu lần lượt là 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 và 30:1 (v/w) và nhiệt độ siêu âm lần lượt là 10, 30, 50, 70 và 90°C. Kết quả của thí nghiệm trước là điều kiện sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp chiết tách flavonoid toàn phần

Bột hạt sen (d = 1 mm) sau khi cân được cho vào bình tam giác loại 500 mL, lắc đều. Hàm lượng flavonoid toàn phần chiết tách bằng phương pháp siêu âm bề với các điều kiện như được mô tả ở phần bố trí thí nghiệm. Dịch chiết chứa flavonoid toàn phần sẽ được thu hồi bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút trên máy ly tâm lạnh tốc độ cao (Hettich - Đức). Dịch thu được tiến hành xác định hàm lượng flavonoid toàn phần theo mô tả của Chang và đồng tác giả (2002).

Xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định theo mô tả của Chang và đồng tác giả (2002). Ethanol được sử dụng để pha loãng dung dịch Catechin chuẩn (Sigma) đạt nồng độ 6,26; 12,5; 25, 50; 100; 200 và 300 µg/mL; dung dịch AlCl₃ 10% và dung dịch CH₃COOK 1M được pha loãng với nước. Lần lượt cho 0,5 mL dung dịch Catechin chuẩn (nồng độ 6,26; 12,5; 25, 50; 100; 200 và 300 µg/mL) vào 1,5 mL ethanol và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL AlCl₃ 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH₃COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau 45 phút, tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ UV - Vis (U2900 Hitachi, Nhật Bản) ở bước sóng 415 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng tuyến tính để sử dụng xác định hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu dịch chiết. Các mẫu dịch chiết được tiến hành tương tự với Catechin (Chang et al., 2002).

Hàm lượng flavonoid tổng được tính theo công thức:

$$F = c \times V/m$$

Trong đó:

F: hàm lượng flavonoid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất);

c: giá trị x từ đường chuẩn với Catechin (mg/mL);

V: thể tích dịch chiết (mL);

m: khối lượng mẫu có trong thể tích V (g).

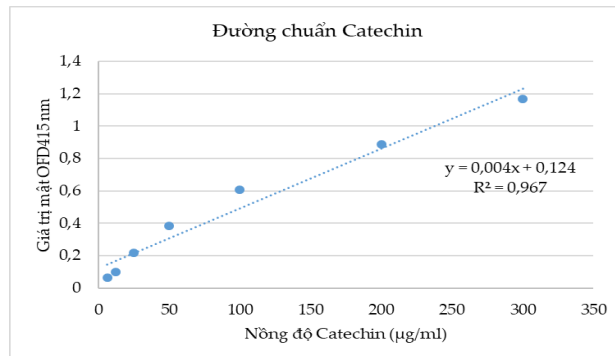
Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010, SPSS Statistics 20.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xây dựng phương trình đường chuẩn Catechin

Dung dịch Catechin chuẩn được pha loãng trong dung môi ethanol 70% để đạt các nồng độ 6,26; 12,5; 25, 50; 100; 200 và 300 µg/mL. Các nồng độ Catechin này được cho tạo phức màu với hỗn hợp dung dịch AlCl₃ 10% và dung dịch CH₃COOK 1M được pha loãng với nước. Kết quả tạo phức màu được đo ở bước sóng 415 nm trên máy UV - Vis (U2900 Hitachi, Nhật Bản) thể hiện ở hình 1 cho thấy giá trị mật độ quang thu được từ các nồng độ Catechin khác nhau thể hiện mối tương quan cao (R² = 0,967) và phương trình tuyến tính thu được từ các nồng độ Catechin này là y = 0,004x + 0,124 (hình 1).



Hình 1. Sơ đồ thể hiện mối tương quan giữa các nồng độ Catechin khác nhau

Ảnh hưởng của thời gian siêu âm bề

Thời gian siêu âm nhằm trích ly flavonoid phụ thuộc vào nguyên liệu, dung môi và nhiệt độ chiết. Khi thời gian trích ly càng dài thì hiệu suất thu hồi càng cao. Tuy nhiên, đến một ngưỡng thời gian nhất định đối với phương pháp siêu âm bề thì việc tăng thời gian trích ly không làm tăng hiệu quả tách chiết flavonoid toàn phần mà thay vào đó hàm lượng flavonoid toàn phần thu được có thể giảm đi do dưới tác dụng của cường độ sóng siêu âm trong thời gian dài, một số flavonoid có cấu trúc hóa học yếu sẽ bị đứt gãy. Do vậy, xác định thời gian trích ly cho thích hợp cũng là một yếu tố rất cần thiết. Thời gian được khảo sát cho phương pháp siêu âm bề là 30, 60, 90, 120 và 150 phút trong dung môi ethanol 70% ở 50°C với cường độ sóng siêu âm 10 Hz, pH dung môi = 7, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (5:1). Hiệu quả trích ly flavonoid toàn phần từ hạt sen ở các mức thời gian khác nhau được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen

Thời gian (phút)	Hàm lượng flavonoid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất)
30	0,705 ^{ab} ± 0,004
60	0,720 ^b ± 0,009
90	0,827 ^a ± 0,006
120	0,803 ^{ab} ± 0,010
150	0,703 ^b ± 0,115
LSD _{0,05}	0,001

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 95% bằng phép thử Turkey, ghi chú này được sử dụng cho tất cả các bảng.

Kết quả thể hiện ở bảng 1 cho thấy, thời gian cho hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất là ở 90 phút với giá trị tương ứng là 0,827 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,006 và thấp nhất là ở 150 phút tương ứng 0,703 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,115, sai số có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất 95%. Hàm lượng flavonoid toàn phần có sự biến động nhẹ từ 30 phút đến 90 phút và lại giảm đi cho đến 150 phút. Do trong giai đoạn đầu, thời gian ngắn, nên khả năng tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi ngắn, chỉ có những hợp chất hữu cơ có kích thước nhỏ hòa tan vào dung môi. Khi tăng thời gian chiết thì thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi cũng tăng lên, lúc này các hợp chất có khối lượng phân tử lớn dưới ảnh hưởng của độ phân cực của dung môi sẽ được trích ly ra khỏi nguyên liệu, do đó hàm lượng hợp chất flavonoid toàn phần thu được cũng tăng lên. Sau đó, hàm lượng flavonoid toàn phần hầu như không tăng lên mà có xu hướng giảm xuống. Nguyên nhân có thể là do tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu chưa đủ để trích ly hoàn toàn flavonoid toàn phần hoặc dưới tác động của cường độ sóng siêu âm trong thời gian dài đã làm cho một số flavonoid toàn phần nhạy cảm với sóng siêu âm bị phân hủy làm mất tính chất của nó. Mặt khác, nguyên liệu được ngâm trong dung môi một thời gian dài sẽ trương nở làm bít lỗ thông của màng tế bào, cản trở khả năng thẩm thấu của dung môi vào nguyên liệu nên hiệu suất chiết flavonoid toàn phần giảm. Như vậy, thời gian chiết 90 phút được chúng tôi lựa chọn sử dụng cho những thí nghiệm khảo sát tiếp theo (bảng 1).

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi ethanol

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi lên quá trình trích ly flavonoid toàn phần có trong hạt sen được tiến hành trong thời gian 90 phút ở 50°C với cường độ sóng siêu âm 10 Hz, pH dung môi = 7, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (5:1). Từ kết quả bảng 2 cho thấy, trong cùng một điều kiện, khi chiết ở nồng độ khác nhau thì sẽ cho hàm lượng flavonoid toàn phần khác nhau và hàm lượng flavonoid toàn phần bắt đầu tăng lên khi chiết ở nồng độ từ 30% đến 70% và hàm lượng flavonoid toàn phần đạt cao nhất tại nồng độ ethanol 70% với giá trị thu được tương ứng 0,743 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,007. Tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 90% thì hàm lượng flavonoid toàn phần không tăng mà có xu hướng giảm xuống. Điều này là do mức độ phân cực của dung môi phụ thuộc vào hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro, trong đó nước có hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro cao hơn ethanol. Do đó, khi trộn lẫn ethanol và nước sẽ cho các hỗn hợp ethanol nước có mức độ phân cực khác nhau, nồng độ dung môi có độ phân cực tương đương với hợp chất được trích ly sẽ hòa tan chất đó tốt hơn. Do vậy, nồng độ ethanol 70% là thích hợp nhất để thực hiện quá trình tách chiết flavonoid toàn phần từ hạt sen (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen

Nồng độ (%)	Hàm lượng flavonotid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất)
30	0,197 ^c ± 0,015
50	0,343 ^b ± 0,062
70	0,743 ^a ± 0,007
90	0,671 ^a ± 0,008
LSD _{0,05}	0,006

Ảnh hưởng của pH dung môi đến quá trình chiết

Ảnh hưởng của pH dung môi đến hàm lượng flavonoid toàn phần thu được ở các mức pH là 3; 4; 5; 6; 7. Các thông số kỹ thuật khác bao gồm dung môi ethanol 70%, trong thời gian siêu âm (90 phút) ở 50°C với cường độ sóng siêu âm 10 Hz, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (5:1). Kết quả ảnh hưởng của pH đến hàm lượng flavonoid toàn phần hạt sen được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH dung môi đến hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen

pH	Hàm lượng flavonotid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất)
3	0,661 ^{bc} ± 0,062
4	0,732 ^a ± 0,004
5	0,717 ^{ab} ± 0,013
6	0,687 ^b ± 0,053
7	0,620 ^c ± 0,049
LSD _{0,05}	0,175

Kết quả thể hiện ở bảng 3 cho ta thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen tăng khi tăng pH dung môi từ 3 lên 4 và đạt cao nhất tại đó với giá trị tương ứng 0,732 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,004. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng pH lên đến mức trung tính thì hàm lượng flavonoid toàn phần có xu hướng giảm và đạt thấp nhất ở điều kiện pH 7 với giá trị tương ứng là 0,620 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,049. Nguyên nhân do flavonoid là hợp chất có tính chống oxy hóa mạnh nên dễ bị oxy hóa khi điều chỉnh mức pH của dung môi chiết lên cao. Như vậy, giá trị pH 4 được được sử dụng cho thí nghiệm khảo sát tiếp theo (bảng 3).

Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến quá trình chiết

Với thời gian chiết 90 phút, nồng độ dung môi ethanol 70%, và pH 4, cường độ sóng siêu âm 10 Hz, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 5:1, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ siêu âm bề đến quá trình tách chiết flavonoid toàn phần có trong hạt sen, kết quả của quá trình khảo sát được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm bề đến hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen

Nhiệt độ	Hàm lượng flavonotid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất)
10	0,678 ^c ± 0,007
30	0,767 ^d ± 0,012
50	0,792 ^a ± 0,006
70	0,790 ^{ab} ± 0,002
90	0,783 ^b ± 0,006
LSD _{0,05}	0,001

Kết quả thể hiện ở bảng 4 cho thấy, khi tăng nhiệt độ từ 10 lên 50°C, hàm lượng flavonoid tăng lên đáng kể, từ 0,678 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,007 lên 0,792 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,006, tuy nhiên khi nhiệt độ tăng lên đến 70 và 90°C thì hàm lượng flavonoid thu được lại có xu hướng giảm đi, điều này có thể lí giải là khi tăng nhiệt độ, khả năng khuếch tán của các chất trong tế bào ra môi trường chiết tốt hơn nhưng nếu nhiệt độ tăng quá

cao, không chỉ độ tan của chất tăng mà độ tan của tạp chất cũng tăng theo, khi đó dịch chiết sẽ lẫn nhiều tạp hoặc một phần do tinh bột có trong hạt sen bị hồ hóa gây cản trở quá trình tách chiết, chính vì vậy hàm lượng flavonoid toàn phần thu được giảm xuống (bảng 4).

Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến quá trình chiết

Từ các điều kiện cho lượng flavonoid tách chiết tối ưu thu được ở các thí nghiệm trước, ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng flavonoid toàn phần thu được từ hạt sen được khảo sát là 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 và 30:1 (v/w). Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng flavonoid toàn phần trong hạt sen

Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	Hàm lượng flavonoid toàn phần (mg Catechin/g chiết xuất)
5	0,629 ^d ± 0,007
10	1,021 ^c ± 0,026
15	1,526 ^b ± 0,058
20	1,670 ^b ± 0,155
25	2,133 ^a ± 0,015
30	1,591 ^b ± 0,034
LSD _{0,05}	0,010

Kết quả thể hiện ở bảng 5 cho thấy tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp nhất cho quá trình trích ly flavonoid toàn phần trong hạt sen là 25:1 (v/w), tương ứng với hàm lượng flavonoid thu được là 2,133 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,015. Khi chúng ta tăng tỉ lệ lên 30:1 (v/w) thì hàm lượng flavonoid toàn phần thu được giảm xuống còn 1,591 (mg Catechin/g chiết xuất) ± 0,034, sai số có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất 95% (bảng 5).

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu trên, hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất theo tính toán lý thuyết trong dịch chiết từ hạt sen bằng phương pháp siêu âm bề ở thời gian 90 phút; nồng độ dung môi 70%; pH 4; nhiệt độ 50°C và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 25:1.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu được hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang CC, Wen HM, Yang MH, Cherm JC (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3):178-182.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SC (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*, 3:e2802.
- Itoh A, Saitoh T, Tani K, Uchigaki M, Sugimoto Y, Yamada J, Nakajima H, Ohshiro H, Sun S, Tanahashi T (2011). Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Nelumbo nucifera*. *Chem Pharm Bull*, 59(8): 947-951. doi: 10.1248/cpb.59.947.
- Jung HA, Jin SE, Choi RJ, Kim DH, Kim YS, Ryu JH, Kim DW, Son YK, Park JJ, Choi JS (2010). Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1. *Life Science*, 87: 420–430. doi: 10.1016/j.lfs.2010.08.005.
- Kredy HM, Huang DH, Xie BJ, He H, Yang EN, Tian BQ, Xiao D (2010). Flavonols of lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) seed epicarp and their antioxidant potential. *European Food Research and Technology*, 231(3): 387-394.
- Liao CH, Guo SJ, and Lin JY (2010). Characterisation of the chemical composition and in vitro anti-inflammation assessment of a novel lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharide. *Food Chemistry*, 125: 930–935. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.082.
- Liu W, Yi DD, Guo JL, Xiang ZX, Deng LF, and He L (2015). Nuciferine, extracted from *Nelumbo nucifera* Gaertn, inhibits tumor-promoting effect of nicotine involving Wnt/?- catenin signaling in non-small cell lung cancer. *J Ethnopharmacology*, 165: 83-93.
- Paran I, Michelmore RW (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 85: 985-999.
- Poornima P, Weng CF, and Padma VV (2014). Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest. *BioFactors*, 40(1): 121–131.

Ruvanthika PN, Manikandan S, and Lalitha S (2017). A comparative study on phytochemical screening of aerial parts of *Nelumbo nucifera gaertn* by gas chromatographic mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Sesearch*, 8(5): 2320-5148.

Vijayan K, Tsou CH (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99: 1530 - 1540.

Xie Y, Zhang Y, Zhang T, Zeng SX, Guo ZB, and Zheng BD (2013). Protective effects of alkaloid compounds from *Nelumbinis Plumula* on tert-Butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mol*, 18: 10285–10300. doi: 10.3390/molecules180910285.

EFFECTS OF A NUMBER OF FACTORS ON THE PROCEDURE EXTRACTION TOTAL FLAVONOID FROM LOTUS SEEDS BY BATH ULTRASOUND-ASSISTED METHOD

Dang Thanh Long^{1*}, Hoang Thi Kim Hong², Le Ly Thuy Tram³, Nguyen Thi Quỳnh Trang⁴, Nguyen Phan Thuy Tien²

¹ *Institute of Biotechnology, Hue University*

² *University of Sciences, Hue University*

³ *University of Science and Technology, the University of Da Nang*

⁴ *University of Education, Hue University*

SUMMARY

Lotus seeds have been proved that have many different pharmacological properties such as antioxidants, anti-inflammatory, anti-memory loss and anti-tumor activity. Some scientists suggest that the bioactive or medicinal compounds in lotus seeds play an important role and are naturally alkaloid and flavonoid. The purpose of this study is to survey some single-factors, cover: ethanol solvent concentration, pH solvent, bath ultrasound time, solvent/material ratio and bath ultrasound temperature which influence the procedure of total flavonoid extraction from lotus seed. According to the theoretical calculations, we obtained the highest total flavonoid content in lotus seed, extracted by bath ultrasound method at 90 minutes; solvent concentration was 70%; pH solvent was 4; temperature was at 50°C and solvent/material ratio was 25:1.

Key words: Bath ultrasound, Extract, flavonoids, Lotus seeds, optimal.

* Author for corresspondence: Tel: 0914.207.992; Email: dtlong@hueuni.edu.vn