

Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. (1991), Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 757-766. 14. Cuong N. X., Vien L. T., Hanh T. T., Thao N. P., Thao D. T., Thanh N. V., Nam N. H., Thung do C., Kiem P. V., Minh C. V. (2015), Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 3151-3156. 15. Krenn L., Miron A., Pemp E., Petr U., Kopp B. (2003), Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 58, 11-16. 16. Laggoun S., Boutagane N., Kabouche A., Kabouche Z., Ait-Kaki Z., Ait-Kaki B. (2008), Components and antimicrobial activity of *Lamium amplexicaule* from Algeria, *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 363-364. 17. Iwashina T., Ootani S., Hayashi K. (1984), Neochilenin, a new glycoside of 3-O-methylquercetin, and other flavonols in the tepals of *Neochilenia*, *Neoporteria* and *Parodia* species (Cactaceae), *The Botanical Magazine*, 97, 23-30. 18. Yukinori M., Tsuyoshi T. (1995), Studies on the constituents of *Scutellaria* species XVII: Phenol glycosides of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi (2), *Natural Medicines*, 49, 350-353. 19. Ye X., Tian W., Wang G., Zhang X., Zhou M., Zeng D., Liu X., Yao X., Zhang Y., Chen H. (2020), Phenolic glycosides from the roots of *Ficus hirta* Vahl. and their antineuroinflammatory activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 4196-4204. 20. Wu Q., Bang M. H., Cho J. G., Lee D. Y., Lee K. T., Chung H. G., Choi M. S., Jeong T. S., Ahn E. M., Kim G. S., Baek N. I. (2013), Phenolic compounds from the roots of *Brassica rapa* ssp. *campestris*, *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 852-856.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 28 - 35)

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO GIÀU HỢP CHẤT LIGNAN TỪ QUẢ NGŨ VỊ TỬ THU TẠI VÙNG NÚI NGỌC LINH, VIỆT NAM

Lê Xuân Duy¹, Đỗ Quang Thái¹, Đỗ Thị Thùy Linh¹, Nguyễn Minh Khởi¹,
Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Thị Nụ¹, Ninh Quang Nhã², Nguyễn Thị Hà Ly^{1,*}

¹Viện Dược liệu (NIMM); ²Trường Đại học Dược Hà Nội

*Email: nguyenthialy.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2023)

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát, đánh giá ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất cũng như một số điều kiện công nghệ đến quá trình chiết xuất nhằm thu được cao chiết giàu hợp chất lignan từ quả ngũ vị tử (*Schisandra sphenanthera*) thu tại vùng núi Ngọc Linh, Việt Nam. Các yếu tố được khảo sát gồm có dung môi chiết, kích thước dược liệu, tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi, số lần chiết và thời gian chiết. Ngoài ra, một số phương pháp tinh chế, làm giàu lignan trong cao ngũ vị tử cũng được khảo sát. Tiêu chí dùng để đánh giá và lựa chọn điều kiện chiết xuất là hàm lượng lignan tổng số (tính theo tổng 3 hợp chất schisandrin, gomisin B và schisandrin A) bằng phương pháp HPLC-DAD. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp chiết nóng ở 60°C là phù hợp nhất để chiết xuất ngũ vị tử. Các điều kiện công nghệ chiết xuất phù hợp nhất cả về yếu tố kỹ thuật và kinh tế gồm: dung môi chiết là ethanol 80%, kích thước nguyên liệu 1 - 3 mm, chiết 2 lần, mỗi lần 1 giờ, với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/8 và 1/5 (g/mL) và tổng thời gian chiết là 2 giờ. Quá trình tinh chế làm giàu hợp chất lignan được thực hiện bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng từ pha nước và dung môi ethyl acetat với tỷ lệ 1/1 (v/v), chiết phân bố 3 lần. Ở quy mô 5 g dược liệu, cao chiết thu được có hàm lượng lignan trung bình đạt 6,39%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 84,47%. Ở quy mô 2 kg dược liệu/mẻ, cao chiết thu được có hàm lượng lignan đạt 6,24%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 68,93%.

Từ khóa: Ngũ vị tử, Núi Ngọc Linh, Chiết xuất, Lignan.

Summary

The Extraction Procedure of a Lignan-Rich Extract from the Fruits of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. (Schisandraceae) Collected in Ngọc Linh Mountain, Vietnam

In this study, we evaluated some conditions affecting the extraction of lignans from the fruits of *Schisandra sphenanthera* collected in the Ngọc Linh mountains, Vietnam. The investigated factors included extraction method, extraction solvent, medicinal plant size, material mass/solvent volume ratio, extraction time, and number of extraction times. Additionally, several methods of refining and enriching lignans in the *Schisandra sphenanthera* extract were also investigated. The criteria used to evaluate and select extraction conditions was the total lignan content (calculated according to the total of three lignans schisandrin, gomisin B, and schisandrin A) by the HPLC-DAD method. The best results included using hot extraction at 60°C, extraction solvent of 80% ethanol, material size of 1 - 3 mm, extraction two times and 1 hour each time, with material/solvent ratios of 1/8 and 1/5 (g/mL), and a total extraction time of 2 hours. The process of refining and enriching the lignan component was carried out using a liquid-liquid distribution with ethyl acetate solvent from the aqueous phase at a ratio of 1:1 (v/v), extracted three times. The obtained extract after refining had a lignan content of 6.39%, and the lignan recovery efficiency of the whole process was 84.47% in the laboratory scale (5 g). In the 2 kg scale extraction procedure, the obtained extract had a lignan content of 6.24% and the lignan recovery efficiency was 68.93%.

Keywords: *Schisandra sphenanthera*, Ngọc Linh mountain, Extraction, Lignans.

1. Đặt vấn đề

Gan là cơ quan đảm nhận nhiều chức năng quan trọng của cơ thể, giúp bảo vệ cơ thể và loại bỏ các chất độc trong cơ thể. Khi tế bào gan bị tổn thương sẽ làm suy giảm chức năng gan, dẫn đến nhiều loại bệnh khác nhau như sỏi mật, đái tháo

đường, gout, mỡ máu, béo phì..., vì vậy cần thiết nghiên cứu các thuốc có tác dụng bảo vệ gan [1]. Việt Nam là nước có nguồn dược liệu rất phong phú, trong đó có một số dược liệu được dùng để chữa các bệnh về gan như: Cà gai leo, diệp hạ châu, ngũ vị tử...[2],[3]. Dược liệu ngũ vị tử đã

được nhiều nghiên cứu trên thế giới chứng minh có tác dụng bảo vệ gan, giải độc cơ thể [4],[5]. Năm 2005, ở vùng núi Ngọc Linh, Việt Nam, có một loài ngũ vị tử được ghi nhận với tên khoa học là *Schisandra sphenanthera* Rehder & E.H.Wilson, thuộc chi ngũ vị tử (*Schisandra*), họ Ngũ vị (*Schisandraceae*) [2]. Nhiều nghiên cứu chứng minh được tác dụng bảo vệ gan của ngũ vị tử là nhờ vào nhóm hoạt chất dibenzocyclooctadien lignan, gồm một số chất như: schisandrin, schisandrin A, angeloylgomisin P, gomisin U, angeloylgomisin P, gomisin B, schisantherin C, schisantherin D, schisantherin E, schisandrin A [5],[6],[7]. Tuy nhiên, cho đến nay ở Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu đầy đủ về quy trình chiết xuất hợp chất lignan cũng như đánh giá tác dụng bảo vệ gan từ dược liệu ngũ vị tử thu tại vùng núi Ngọc Linh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất và các yếu tố công nghệ đến quá trình chiết xuất hợp chất lignan từ ngũ vị tử (*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils., *Schisandraceae*) thu tại vùng núi Ngọc Linh, Việt Nam. Hàm lượng lignan tổng trong cao chiết được tính theo hàm lượng ba hợp chất: schisandrin, gomisin B và schisandrin A.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

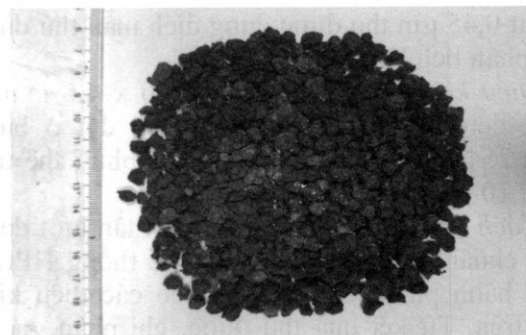
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu quả ngũ vị tử được thu hái tự nhiên vào tháng 9/2020 ở vùng núi Ngọc Linh, Kon Tum, Việt Nam. Mẫu nghiên cứu đã được PGS. TS. Phạm Thanh Huyền và ThS. Nguyễn Văn Hiếu (Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu) giám định tên khoa học là *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils., *Schisandraceae*. Mẫu sau khi thu được rửa sạch, sấy diệt men ở 115°C trong 20 phút và sấy đến khô (hàm ẩm < 10%) ở nhiệt độ $55 \pm 5^\circ\text{C}$. Cuối cùng mẫu được liệu được đóng trong túi PE, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng (28-30°C).

Pha động: Kênh A: nước, kênh B: ACN được chạy theo chương trình gradient:

Thời gian (phút)	0 - 17	17 - 35	35 - 50	50 - 55	55 - 60
%ACN	50	50 - 75	75	75 - 50	50

Dung dịch chuẩn: chuẩn bị 3 dung dịch chuẩn gốc schisandrin, gomisin B và schisandrin A có nồng độ mỗi chất là 1.000 µg/mL trong methanol. Từ mỗi dung dịch chuẩn gốc này, pha **dung dịch chuẩn hỗn hợp** (schisandrin, gomisin B và schisandrin A) có nồng độ của mỗi chất là 200 µg/mL; từ dung dịch hỗn hợp chuẩn này, tiến hành pha loãng bằng methanol để thu được các dung dịch hỗn hợp chuẩn có nồng độ các chất



Hình 1. Mẫu ngũ vị tử khô thu hái ở vùng núi Ngọc Linh

Trước khi dùng trong nghiên cứu, mẫu ngũ vị tử khô được nghiền nhỏ, sử dụng rây bột có kích thước mắt 0,35 và 1 mm để phân loại kích thước. Mẫu dùng trong nghiên cứu được xác định hàm ẩm đạt 3,09% và hàm lượng lignan tổng tính trên 3 thành phần schisandrin, gomisin B và schisandrin A đạt 0,59%.

2.2. Dung môi, hóa chất

- Các chất chuẩn schisandrin của USP (CAS 1609895; Lot: F00810; độ tinh khiết 98%), gomisin B (CAS: 58546-55-7, LOT: PRF10042941, độ tinh khiết 98%) và schisandrin A của hãng Biopurify Phytochemicals Ltd (CAS: 61281-38-7; Lot: BP1261, độ tinh khiết 98%).

- Các dung môi, hóa chất dùng trong phân tích HPLC của hãng Merck (Đức).

- Các dung môi (ethanol, methanol, *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat) dùng trong chiết xuất của hãng Xilong Scientific, Trung Quốc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp HPLC-DAD định lượng lignan tổng trong cao chiết ngũ vị tử:

Phương pháp HPLC-DAD định lượng lignan tổng số (tính theo tổng 3 chất schisandrin, gomisin B và schisandrin A) trong cao chiết ngũ vị tử được thực hiện theo tài liệu tham khảo [8], gồm các điều kiện phân tích như sau:

trong khoảng từ 10 - 200 µg/mL. Khoảng nồng độ xây dựng đường chuẩn ứng với từng chất là: 20 - 200 µg/mL đối với schisandrin và gomisin B; 10-100 µg/mL đối với schisandrin A.

Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 0,12 g mẫu thử, chuyển vào bình định mức 50 ml, thêm ethanol vào bình gần đến vạch. Sau đó siêu âm 30 phút rồi để yên 5 phút. Bổ sung ethanol tới vạch rồi lắc đều. Lọc qua màng lọc cellulose

acetat 0,45 μ m thu được dung dịch mẫu thử dùng cho phân tích HPLC.

Điều kiện sắc ký: Cột C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μ m); detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm; tốc độ dòng: 0,8 ml/phút; thể tích tiêm: 10 μ l.

Cách tiến hành: Tiêm riêng biệt lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử vào hệ thống HPLC. Tiến hành phân tích sắc ký theo các điều kiện như trên. Từ kết quả thu được, ghi nhận giá trị diện tích pic tương ứng với từng chất định phân trong mẫu thử, mẫu chuẩn. Từ đó, tính hàm lượng của schisandrin, gomisins B và schisandrin A trong mẫu thử theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{C_t \times V}{m \times 10 \times (100 - a)}$$

Trong đó: X (%): Hàm lượng của schisandrin, gomisins B và schisandrin A tương ứng; C_t: Nồng độ schisandrin, gomisins B và schisandrin A tính từ phương trình đường chuẩn (μ g/mL); V: thể tích dung môi chiết (mL); m: Khối lượng mẫu thử (g); a: Độ ẩm của mẫu thử (%).

2.3.2. Phương pháp xây dựng quy trình chiết cao ngũ vị tử giàu hợp chất lignan:

Phương pháp nghiên cứu xây dựng quy trình

$$HS_{\text{lignan}} = \frac{M_{\text{lignan}}}{M_{\text{lignan dl}}} \times 100\%$$

Trong đó: HS_{lignan} (%): hiệu suất chiết lignan; HL_{lignan} (%): hàm lượng lignan; M_{lignan}: khối lượng lignan chiết được; M_{lignan dl}: khối lượng lignan trong dược liệu khô; M_c: Khối lượng cao chiết được.

Phương pháp tinh chế làm giàu hợp chất lignan trong cao chiết ngũ vị tử

Sử dụng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng để tiến hành làm giàu hợp chất lignan trong cao chiết thô ngũ vị tử thu được ở phần nghiên cứu chiết xuất. Cao chiết thô ngũ vị tử (2 g) được phân tán hoàn toàn vào 10 mL nước cất. Sau đó hỗn hợp này được chiết phân bố với các dung môi có độ phân cực tăng dần là n-hexan, dicloromethan và ethyl acetat. Mỗi dung môi chiết 3 lần, mỗi lần 10 mL, gộp các dịch chiết và cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến gần khô, xác định hàm lượng lignan trong mỗi phân đoạn để xác định được phân đoạn có hàm lượng lignan lớn nhất.

2.3.3 **Xác định tồn dư dung môi hữu cơ ethyl acetat:** Thử theo Phương pháp sắc ký khí khối phổ (tham khảo Dược điển Việt Nam, Phụ lục

chiết cao ngũ vị tử giàu hợp chất lignan được thực hiện theo hướng dẫn trong tài liệu tham khảo [9].

Thiết kế thí nghiệm

Lấy chính xác 5 g dược liệu vào bình nón 250 ml. Sử dụng 3 phương pháp chiết khác nhau gồm ngâm chiết (chiết ở nhiệt độ phòng, 28 - 30°C), chiết hồi lưu và chiết nóng ở 60°C với cùng điều kiện chiết để lựa chọn phương pháp chiết hiệu quả sau đó khảo sát đơn yếu tố để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình chiết xuất theo thứ tự lần lượt như sau:

+ Ảnh hưởng của thời gian chiết: 0,5 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ.

+ Ảnh hưởng của dung môi chiết: Nước, ethanol 20%, ethanol 40%, ethanol 60%, ethanol 80% và ethanol 96%, n-hexan, ethyl acetat, methanol và dicloromethan.

+ Ảnh hưởng của kích thước dược liệu: Kích thước 5-10 mm (để nguyên quả), kích thước 1-3 mm và 0,35-1 mm.

+ Ảnh hưởng của tỉ lệ dược liệu/dung môi sử dụng: 1:5, 1:8, 1:10, 1:12 và 1:15 (g/mL).

Hiệu quả quá trình chiết được đánh giá qua hiệu suất chiết lignan và hàm lượng lignan trong cao chiết thu được theo công thức như sau:

$$HL_{\text{lignan}} = \frac{M_{\text{lignan}}}{M_c} \times 100\%$$

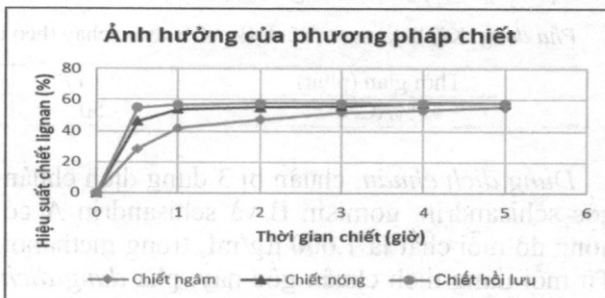
10.14 và Phụ lục 4.5 - Phương pháp sắc ký khí khối phổ và TCVN 12963:2020).

Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD) là 2 ppb. Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ) là 6,6 ppb.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. **Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình chiết xuất cao**

3.1.1. Ảnh hưởng của phương pháp chiết:



Hình 2. Ảnh hưởng của các phương pháp chiết đến hiệu suất chiết lignan theo thời gian

Tiến hành khảo sát hiệu suất chiết lignan từ quả ngũ vị tử theo thời gian chiết ứng với một số

phương pháp chiết sau: Chiết ngâm nhiệt độ phòng, chiết nóng ở 60°C và chiết hồi lưu. Các thông số công nghệ quá trình chiết xuất được cố định gồm: kích thước nghiền 1-3mm, dung môi chiết ethanol 96% (v/v), tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1:10 (g/mL), chiết 1 lần. Kết quả khảo sát phương pháp chiết được trình bày ở đồ thị Hình 2.

Từ kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 3 phương pháp chiết theo thời gian được thể hiện ở Hình 2 cho thấy 2 phương pháp chiết: Chiết nóng ở 60°C, và chiết hồi lưu giúp giảm đáng kể thời gian chiết so với chiết ngâm ở nhiệt độ phòng. Hiệu suất chiết lignan ở trạng thái cân bằng không có sự khác biệt nhiều giữa 3 phương pháp sử dụng. Với phương pháp chiết ngâm ở nhiệt độ phòng, hiệu suất chiết lignan đạt trạng thái cân bằng chiết sau khoảng thời gian là 3 giờ là 51,82%. Đối với phương pháp chiết nóng và phương pháp chiết hồi lưu thì trạng thái cân bằng đạt được sau lần lượt khoảng 1 giờ và 0,5 giờ; Khi đó, hiệu suất chiết lignan không có sự chênh lệch lớn, đạt lần lượt là 53,91% và 54,97%. Xét

về mặt quy trình, khi nâng cấp quy mô chiết xuất thì phương pháp chiết nóng ở 60°C sẽ dễ dàng áp dụng cũng như tiết kiệm chi phí về năng lượng hơn so với phương pháp chiết hồi lưu. Từ kết quả thu được, lựa chọn phương pháp chiết nóng ở 60°C và thời gian chiết xuất là 1 giờ để tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến quá trình chiết xuất lignan từ dược liệu ngũ vị tử.

3.1.2. Ảnh hưởng của loại dung môi sử dụng:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm chiết lignan từ dược liệu với một số loại dung môi có độ phân cực tăng dần như *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat, methanol, ethanol, nước và hỗn hợp ethanol - nước. Các thông số công nghệ quá trình chiết xuất được cố định gồm: kích thước nghiền 1 - 3 mm, tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1:10 (w/v), nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 1 giờ, chiết 1 lần. Kết quả phân tích hiệu suất chiết lignan, hàm lượng lignan trong cao chiết và hàm lượng cao chiết được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi sử dụng

Dung môi	Hàm lượng cao chiết được (%)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao (%)	Hiệu suất chiết lignan (%)
Nước	27,41	0,33	16,73
Ethanol 20%	29,06	0,53	28,01
Ethanol 40%	29,23	0,94	48,24
Ethanol 60%	26,09	1,01	52,46
Ethanol 80%	25,45	1,25	57,97
Ethanol 96%	22,35	1,26	55,41
MeOH	22,29	1,31	56,39
<i>n</i> -Hexan	0,91	11,28	18,47
Dicloromethan	0,74	9,25	12,47
Ethyl acetat	1,21	5,14	11,25

Từ kết quả trên ta thấy các dung môi nước, *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat cho khả năng chiết kém hơn so với hỗn hợp dung môi ethanol - nước và methanol. Dựa vào cấu trúc hoá học của nhóm hợp chất lignan có thể thấy đây là nhóm hoạt chất kém phân cực nên khả năng hòa tan của nước sẽ là kém hơn so với các dung môi như *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat. Các dung môi này có khả năng hòa tan tốt hơn và chọn lọc đối với các hợp chất kém phân cực và phân cực trung bình tuy nhiên khả năng thẩm thấu qua màng tế bào cellulose dược liệu của các dung môi này không cao nên các dung môi này mặc dù đều cho hàm lượng lignan trong cao chiết lớn tuy nhiên hiệu suất chiết lignan trong dược liệu lại thấp. Với hỗn hợp dung môi ethanol-nước đây là dung môi có tính thẩm và thẩm thấu tốt cũng như khả năng hòa tan được nhiều nhóm hoạt chất khác

nau. Kết quả cho thấy hiệu suất chiết lignan và hàm lượng lignan trong cao chiết có xu hướng tăng nhanh từ nước đến ethanol 80%, từ ethanol 80% đến ethanol 96% thì không có sự thay đổi đáng kể. Về hàm lượng lignan trong cao có sự chênh lệch không quá lớn từ nồng độ ethanol 40% đến 96% dao động trong khoảng từ 0,94% đến 1,26%. Ethanol 80% cho hiệu suất chiết lignan cao nhất 57,97%; bên cạnh đó hàm lượng lignan trong cao chiết và hàm lượng cao chiết được đều rất lớn lần lượt là 1,25% và 25,45%. Do đó ethanol 80% được lựa chọn sử dụng làm dung môi chiết xuất cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu:

Kích thước nguyên liệu là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới quá trình chiết xuất lignan. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát ở 3 dạng kích

thước: Kích thước thô 5 - 10 mm (để nguyên quả), 1 - 3 mm và 0,35 - 1 mm. Các thông số công nghệ quá trình chiết xuất được cố định gồm: dung môi chiết ethanol 80%, tỉ lệ dược liệu/dung môi là 1:10

(g/mL), nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 1 giờ, chiết 1 lần. Kết quả phân tích hiệu suất chiết lignan, hàm lượng lignan trong cao chiết và hàm lượng cao chiết được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu

Loại kích thước	Hàm lượng cao chiết được (%)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao (%)	Hiệu suất chiết lignan (%)
Kích thước thô 5 - 10 mm (để nguyên quả)	17,75	0,23	7,31
Kích thước nghiền 1 - 3 mm	26,71	1,19	57,96
Kích thước nghiền mịn 0,35 - 1 mm	22,57	1,31	60,19

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của kích thước dược liệu được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy việc nghiền nhỏ kích thước dược liệu giúp tăng hiệu quả chiết lignan đáng kể so với dạng nguyên liệu thô đường kính 5 - 10 mm, cụ thể hiệu suất chiết lignan dạng kích thước thô chỉ đạt 7,31% trong khi với dạng nguyên liệu nghiền kích thước 1 - 3 mm và kích thước 0,35 - 1 mm hiệu suất chiết lần lượt đạt 57,96% và 60,19%. Về hàm lượng lignan trong cao thì ở 2 dạng kích thước nghiền không chênh lệch nhau quá nhiều (lần lượt là 1,19% với kích thước 1 - 3 mm và 1,31% với kích thước 0,35 - 1 mm). Kết quả cho thấy dạng nghiền kích thước 0,35 - 1 mm cho hiệu suất và hàm lượng lignan thu được tốt nhất tuy nhiên khi ứng dụng quy trình ở quy mô lớn, dạng kích thước nguyên liệu 0,35 - 1 mm rất khó để lọc thu dịch chiết so với dạng kích thước 1-3 mm. Vì vậy trong nghiên cứu này lựa chọn kích

thước nguyên liệu là 1 - 3 mm cho các bước khảo sát tiếp theo.

3.1.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết

Tỷ lệ dược liệu và dung môi chiết cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới hiệu suất chiết. Trong hầu hết các trường hợp khi tăng lượng dung môi chiết thì hiệu suất chiết tăng lên. Nếu dùng quá ít dung môi có thể không chiết hết được hoạt chất tuy nhiên, nếu sử dụng lượng dung môi quá nhiều sẽ gây loãng dịch chiết, tăng lượng tạp chất, gây tốn kém chi phí mà hiệu suất chiết tăng lên không đáng kể. Trong nghiên cứu này, tiến hành thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dược liệu/dung môi từ 1:5 đến 1:15 (g/mL). Các thông số công nghệ quá trình chiết xuất được cố định gồm: dung môi chiết ethanol 80%, kích thước nguyên liệu 1 - 3 mm, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 1 giờ, chiết 1 lần. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dược liệu/dung môi

Tỷ lệ dược liệu/dung môi (w/v)	Hàm lượng cao chiết được (%)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao (%)	Hiệu suất chiết lignan (%)
1:5	22,78	1,09	45,45
1:8	26,51	1,03	55,47
1:10	29,93	1,05	57,95
1:12	30,92	1,03	58,15
1:15	31,14	1,03	58,18

Kết quả cho thấy, khi tăng lượng dung môi sử dụng thì hiệu suất chiết lignan có xu hướng tăng. Tuy nhiên tốc độ tăng có sự khác nhau, tăng mạnh trong khoảng từ tỷ lệ 1:5 đến 1:8 (hiệu suất chiết lignan tăng từ 45,45 đến 57,95%) và chậm dần từ tỷ lệ 1:8 đến 1:15 (hiệu suất chiết lignan tăng từ 57,95 đến 58,18%). Về hàm lượng lignan trong cao thì giữa các tỉ lệ chiết thì không có sự chênh lệch lớn, đều đạt hàm lượng trên 1%. Vậy nên cân đối giữa yếu tố lượng dung môi sử dụng và hiệu suất chiết lignan. Do đó, tỉ lệ chiết dược liệu/dung môi là 1:8 được lựa chọn cho nghiên cứu này.

3.1.5. Ảnh hưởng của số lần chiết

Từ kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dược

liệu/dung môi ở trên ta thấy rằng hiệu suất chiết lignan chiết 1 lần mới chỉ đạt ở mức khoảng 55-58%. Do đó việc tăng số lần chiết để lấy nốt lượng hoạt chất lignan còn lại trong dược liệu là cần thiết. Tuy nhiên ở các lần chiết sau có thể xem xét giảm bớt lượng dung môi sử dụng để chiết giúp tiết kiệm chi phí. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết ở các mức như trong Bảng 4. Các thông số công nghệ quá trình chiết xuất được cố định gồm: dung môi chiết ethanol 80%, kích thước nguyên liệu 1 - 3 mm, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 1 giờ, 1 lần chiết. Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết

Tỷ lệ dược liệu/dung môi (w/v), số lần chiết	Hàm lượng cao chiết được (%)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao (%)	Hiệu suất chiết lignan (%)
1:5 + 1:5; chiết 2 lần	30,57	1,03	58,04
1:8 + 1:5; chiết 2 lần	35,74	1,25	77,30
1:8 + 1:8; chiết 2 lần	36,79	1,19	78,87
1:8 + 1:8 + 1:8; chiết 3 lần	36,52	1,20	79,02

Từ các số liệu bảng trên cho thấy khi tăng số lần chiết thì hiệu suất chiết lignan cũng tăng. Điều đó có thể được giải thích là do khi tăng số lần chiết, dược liệu sẽ được tiếp xúc với dung môi mới, qua đó làm tăng chênh lệch nồng độ hoạt chất trong dược liệu và dung môi chiết, giúp thúc đẩy quá trình khuếch tán, dẫn đến tăng lượng hoạt chất thu được. Tuy nhiên, hiệu suất chiết lignan trong phương án chiết 2 lần sử dụng tỷ lệ chiết (1:8 + 1:5) không có sự chênh lệch nhiều so với các phương án chiết với tỷ lệ chiết (1:8 + 1:8) và chiết 3 lần với tỷ lệ chiết (1:8 + 1:8 + 1:8), hiệu suất chiết lignan của 3 phương án dao động từ 77,30 - 79,02%. *Từ kết quả thu được, lựa chọn chiết*

2 lần với tỷ lệ dược liệu/ dung môi lần lượt là 1:8 và 1:5 (w/v), thời gian chiết mỗi lần là 1 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của quá trình tinh chế đến hàm lượng lignan tổng số trong cao ngũ vị tử

Phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng là phương pháp truyền thống thường được sử dụng để làm giàu các nhóm hoạt chất có độ phân cực khác nhau. Để làm giàu hoạt chất lignan trong cao ngũ vị tử, tiến hành chiết phân bố lỏng - lỏng với một số loại dung môi hữu cơ khác nhau như ethyl acetat, *n*-hexan, dicloromethan. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả định lượng các phân đoạn cao chiết của quá trình làm giàu bằng chiết phân bố lỏng - lỏng

Tên mẫu	Khối lượng cao chiết được (g)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao sau tinh chế (%)	Tồn dư dung môi (yêu cầu: Không quá 10 ppm)
Phân đoạn <i>n</i> -hexan	0,092	1,39	
Phân đoạn dicloromethan	0,140	3,78	
Phân đoạn ethyl acetat	0,275	6,39	Không phát hiện

Kết quả cho thấy, việc chiết phân bố lỏng - lỏng với các dung môi là *n*-hexan, dicloromethan và ethyl acetat đều làm tăng hàm lượng lignan trong cao chiết lên lần lượt là 1,39%, 3,78% và 6,39%. Bên cạnh đó khối lượng cao chiết giàu lignan thu được cũng tăng dần tương ứng là 0,092 g, 0,140 g và 0,275 g. Kết quả này cũng cho thấy các hợp chất lignan trong ngũ vị tử chiếm phần lớn là các hợp chất có tính phân cực trung bình tương đồng với tính phân cực của dung môi ethyl acetat, các hợp chất có tính phân cực kém tương đồng với tính phân cực của *n*-hexan là ít hơn rất nhiều. Do đó, lựa chọn dung môi ethyl acetat là dung môi để sử dụng chiết phân bố với cao chiết ngũ vị tử giúp làm giàu hợp chất lignan. Hàm lượng lignan trong cao chiết ban đầu là 1,2%, sau quá trình tinh chế đã thu được cao chiết có hàm lượng lignan đạt 6,39%. Ngoài ra, hiệu suất thu hồi lignan đạt 84,47%.

Do ethyl acetat thuộc nhóm 3 - Các dung môi có độc tính thấp (theo quy định của ĐBVN V) và cần phải được giới hạn vì GMP hoặc vì các yêu cầu chất lượng khác, vì vậy cao chiết ứng với phân đoạn ethyl acetat được đánh giá hàm lượng tồn dư dung môi ethyl acetat theo phương pháp

trình bày trong mục 2.3.3. Kết quả thu được trên Bảng 5 cho thấy cao chiết ứng với phân đoạn ethyl acetat đạt yêu cầu theo quy định trong ĐBVN V (không quá 10 phần triệu).

3.3. Đánh giá độ ổn định của quy trình chiết xuất và nâng cấp quy mô quy trình

3.3.1. Đánh giá độ ổn định của quy trình chiết cao giàu hợp chất lignan từ quả ngũ vị tử ở quy mô 100 g/mẻ:

Quả ngũ vị tử khô được nghiền và rây đến kích thước 1 - 3 mm. Cân chính xác 100 g dược liệu đem đi chiết với dung môi ethanol 80% bằng phương pháp ngâm nóng ở 60°C. Chiết 2 lần với tỷ lệ dược liệu/dung môi lần 1 là 1:8 và lần 2 là 1:5, thời gian chiết 1 giờ/lần. Gộp dịch chiết, sau đó lọc trong dịch bằng phễu lọc Buchner. Dịch chiết sau đó được cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến cạn, sau đó phân tán trong 150 mL nước khử khoáng. Cho dịch chiết và 150 mL ethyl acetat vào bình lắc lỏng - lỏng tiến hành lắc phân đoạn để phân lớp trong 4 giờ. Tiến hành lặp lại 3 lần. Gộp dịch phân đoạn ethyl acetat và tiến hành cô dưới áp suất giảm đến cao đặc. Xác định khối lượng cao chiết, hàm ẩm, hàm lượng lignan trong cao và hiệu suất chiết lignan.

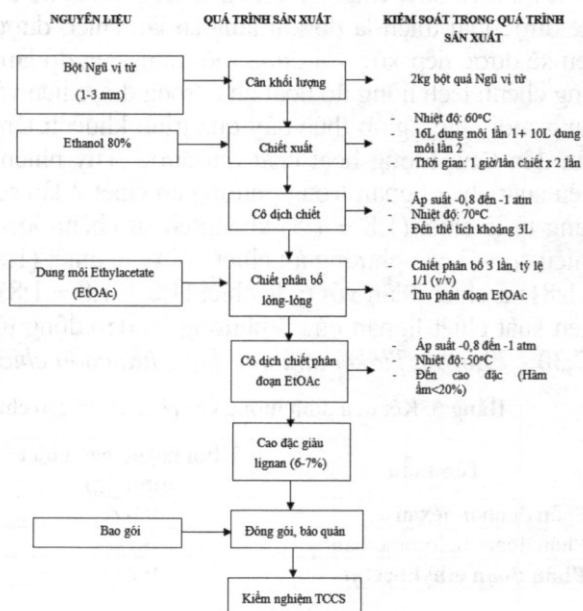
Bảng 6. Kết quả chiết xuất, tinh chế thu cao chiết giàu lignan từ ngũ vị tử quy mô 100 g/mẻ

Lần	Khối lượng cao chiết được (g)	Hàm ẩm (%)	Hàm lượng lignan tổng số trong cao sau tinh chế (%)	Hiệu suất chiết, tinh chế lignan (%)	Tồn dư dung môi (yêu cầu: Không quá 10 ppm)
Mẻ 1	7,24	16,57	6,39	67,15	Không phát hiện
Mẻ 2	6,68	15,84	6,74	67,28	Không phát hiện
Mẻ 3	6,51	16,49	6,53	65,48	Không phát hiện
Trung bình ± SD			6,55 ± 0,18	66,64 ± 1,00	
RSD			2,69	1,51	

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 6 cho thấy không có sự chênh lệch đáng kể giữa hàm lượng và hiệu suất chiết, tinh chế lignan giữa các lần tiến hành. Ở quy mô 100 g/mẻ, hiệu suất chiết và tinh chế lignan trung bình đạt 66,64%, hàm lượng lignan trung bình trong cao sau tinh chế đạt 6,55%. Qua đó có thể thấy, quy định chiết xuất và tinh chế thu cao chiết giàu hợp chất lignan từ ngũ vị tử ở quy mô 100 g/mẻ có độ ổn định cao.

3.3.2. Nâng cấp, ổn định quy trình chiết xuất, tinh chế ở quy mô 2 kg/mẻ

Quy trình chiết xuất được liệu ở quy mô 100 g/mẻ cho thấy các thông số ổn định. Như vậy có thể kì vọng rằng các thông số này khi áp dụng ở quy mô lớn hơn vẫn đem lại hiệu quả tương đương. Tiếp tục tiến hành nâng cấp quy trình chiết xuất, tinh chế lên quy mô 2 kg/mẻ. Quy trình được tiến hành trên thiết bị chiết nóng dung tích 80 lít. Sơ đồ quy trình thực hiện được thể hiện như Hình 3. Kết quả thực hiện được thể hiện ở Bảng 7.



Hình 3. Sơ đồ quy trình chiết xuất, tinh chế thu cao ngũ vị tử giàu hợp chất lignan quy mô 2 kg/mẻ

Bảng 7. Kết quả quá trình chiết xuất, tinh chế thu cao chiết giàu lignan từ ngũ vị tử quy mô 2 kg/mẻ

Lần	Khối lượng cao chiết được (g)	Hàm ẩm (%)	Hàm lượng lignan trong cao sau tinh chế (%)	Hiệu suất chiết, tinh chế lignan (%)	Tồn dư dung môi (yêu cầu: Không quá 10 ppm)
Mẻ 1	146,23	15,36	6,29	66,81	Không phát hiện
Mẻ 2	152,34	16,47	6,25	69,42	Không phát hiện
Mẻ 3	154,39	16,56	6,19	68,95	Không phát hiện
Trung bình ± SD			6,24 ± 0,05	68,93 ± 1,39	
RSD			0,87	2,03	

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 7 cho thấy không có sự chênh lệch đáng kể giữa hàm lượng và hiệu suất chiết, tinh chế lignan giữa các lần tiến hành. Ở quy mô 2 kg/mẻ, hiệu suất chiết và tinh chế lignan trung bình đạt 68,93%, hàm lượng lignan trung bình trong cao sau tinh chế đạt 6,24%. Qua đó có thể thấy, quy trình chiết xuất và tinh chế thu cao chiết giàu hợp chất lignan từ ngũ vị tử ở quy mô 2 kg/mẻ có độ ổn định cao và có thể áp dụng vào thực tế sản xuất ở quy mô pilot.

4. Bàn luận

Lignan là nhóm hoạt chất chính có trong dược

liệu ngũ vị tử (*S. sphenanthera*). Trong đó, schisandrin và gomisin B là hai lignan chính có trong ngũ vị tử thu tại vùng núi Ngọc Linh, Việt Nam [6]. Qua tham khảo một số tài liệu nghiên cứu cho thấy, schisandrin và gomisin B đều là những hoạt chất đã được chứng minh tác dụng sinh học như tác dụng bảo vệ gan của schisandrin [8] và tác dụng cải thiện trí nhớ trong điều trị bệnh Alzheimer của gomisin B [9]. Vì vậy, việc lựa chọn lignan làm tiêu chí chiết xuất cao giàu hoạt chất từ ngũ vị tử thu tại vùng núi Ngọc Linh là phù hợp.

Quy trình chiết xuất cao ngũ vị tử giàu hợp chất lignan được xây dựng dựa trên ba tiêu chí đánh giá: Hàm lượng cao chiết được, hàm lượng lignan tổng số trong cao chiết và hiệu suất chiết lignan. Quy trình chiết xuất sử dụng dung môi là ethanol 80% và tinh chế, làm giàu lignan bằng dung môi ethyl acetat, đều là những dung môi thuộc nhóm 3 (theo quy định trong DDVN) - ít độc và có nguy cơ thấp đối với sức khỏe con người. Từ nguyên liệu là dược liệu ngũ vị tử có hàm lượng lignan tổng tính trên 3 thành phần schisandrin, gomisins B và schisandrin A đạt 0,59%, cao chiết ngũ vị tử thu được có hàm lượng lignan đạt 6,39%, tức là quy trình chiết xuất, tinh chế đã tăng hàm lượng lignan lên 10,8 lần, với hiệu suất chiết lignan đạt 77,3%. Kết quả nghiên cứu quy mô phòng thí nghiệm và nâng cấp lên quy mô 2 kg dược liệu/mẻ cho thấy quy trình chiết xuất, tinh chế cao ngũ vị tử giàu hợp chất lignan là ổn định, khả thi và có thể nâng cấp thành quy mô pilot. Cao chiết ngũ vị tử giàu hợp chất lignan thu được có tiềm năng sử dụng làm nguyên liệu đầu vào cho việc bào chế tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh về gan như viêm gan, xơ gan...

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất và tinh chế thu cao chiết giàu hợp chất lignan từ dược liệu ngũ vị tử Ngọc Linh thu hái tại Kon Tum, Việt Nam ở quy mô phòng thí nghiệm. Các điều kiện chiết xuất được lựa chọn bao gồm: sử dụng phương pháp chiết nóng ở 60°C, dung môi chiết là ethanol 80%, kích thước nguyên liệu 1 - 3 mm, chiết 2 lần với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/8 và 1/5 (g/mL), thời gian chiết là 1 giờ/1 lần chiết. Quá trình tinh chế làm giàu hợp chất lignan được thực hiện bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng với dung môi ethyl acetat với tỷ lệ 1/1 (v/v), chiết 3 lần. Ở quy mô phòng thí nghiệm 5 g dược liệu/mẻ, cao chiết sau tinh chế thu được có hàm lượng lignan đạt 6,39%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 84,47%. Ở quy mô 2 kg dược liệu/mẻ, cao chiết sau tinh chế thu được có hàm lượng lignan đạt 6,24%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 68,93%.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Bộ Y tế - Viện Dược liệu đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ Y tế, đề tài "Nghiên cứu tạo sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh gan mạn tính từ ngũ vị tử (*Schisandra sphenanthera* Rehder et Wills.) thu hái tại Việt Nam".

Tài liệu tham khảo

1. Tạ Thành Văn (2018), Hóa sinh, NXB. Y học, Hà Nội, tr. 353-365.
2. Đỗ Tất Lợi (2004), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB. Y học, Hà Nội, tr. 872-875.
3. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, NXB. Y học.
4. Szopa A., Bamaš M., Ekiert H. (2019), Phytochemical studies and biological activity of three Chinese *Schisandra* species (*Schisandra sphenanthera*, *Schisandra henryi* and *Schisandra rubriflora*): current findings and future applications, *Phytochemistry Reviews*, 18, 109-128.
5. Lu L., Chen D. F. (2009), Review analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*, *Journal of Chromatography A*, 1216, 1980-1990.
6. Wan C. K., Tse A. K., Yu Z. L., Zhu G. Y., Wang H., Fong D. W. F. (2010), Inhibition of cytochrome P450 3A4 activity by schisandrol A and gomisins A isolated from *Fructus Schisandrae chinensis*, *Phytomedicine*, 17(8-9), 702-705.
7. Xu M., Dong Y., Wan S., Yan T., Cao J., Wu L., Bi K., Jia Y. (2016), Schisantherin B ameliorates Aβ1-42-induced cognitive decline via restoration of GLT-1 in a mouse model of Alzheimer's disease, *Physiology & Behavior*, 167, 265-273.
8. Nguyễn Thị Hà Ly, Hoàng Thị Tuyết, Nguyễn Thị Lân Anh, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Minh Khoi (2021), HPLC simultaneous determination of three lignans of *Schisandra sphenanthera* collected in Ngọc Linh mountain, Kon Tum province, Vietnam, *Journal of Medicinal Materials*, 26(5), 288-295.
9. Nguyễn Văn Hân, Đỗ Hữu Nghị (2017), Kỹ thuật chiết xuất dược liệu, *Giáo trình đào tạo dược sỹ đại học*.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 35 - 41)

BÀO CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO KHÔ TỪ BÀI THUỐC CỔ TRUYỀN ĐÀO HỒNG TỬ VẬT THANG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẤY TẦNG SÔI

Nguyễn Hữu Thìn, Nguyễn Thị Minh Anh, Nguyễn Việt Cường, Đoàn Văn Viên, Võ Văn Lệnh*

Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng

*Email: vanlenh@lhu.edu.vn

(Nhận bài ngày 02 tháng 8 năm 2023)

Tóm tắt

Bài thuốc Đào Hồng Tử Vật (ĐHTV) từ lâu được sử dụng dưới dạng thuốc sắc để thúc đẩy lưu thông máu, trị rối loạn kinh nguyệt, các bệnh tim mạch như tăng huyết áp, đau thắt ngực. Tuy nhiên, thuốc sắc có nhiều bất lợi như thời gian sắc lâu, khó sử dụng, khó bảo quản. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm chiết xuất, tiêu chuẩn hóa cao khô từ bài thuốc để tạo nguồn nguyên liệu sản xuất các dạng bào chế hiện đại, thuận tiện cho người dân tiếp cận, sử dụng. Cao khô ĐHTV được điều chế bằng phương pháp: sấy tĩnh và sấy tầng sôi; chuẩn hóa dựa trên các chỉ tiêu chất lượng: cảm quan, độ ẩm, định tính, định lượng, phân bố kích thước hạt, tỷ số Hausner, chỉ số Carr, góc nghỉ. Phương pháp sấy tầng sôi cho những đặc tính vượt trội hơn so với sấy tĩnh như rút ngắn thời gian; cao khô có lưu tính, độ chảy tốt, phân bố cỡ hạt đồng đều, đạt chỉ tiêu định tính, định lượng.

Từ khóa: Đào Hồng Tử Vật Thang, Cao khô, Ferulic acid, HPLC, Phương pháp tạo hạt tầng sôi.