

TỐI ƯU HOÁ QUY TRÌNH LOẠI TẠP VÀ TĂNG HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT TRONG BẢO CHẾ CAO ĐẶC LÁ XOÀI

Nguyễn Ngọc Nhã Thảo *, Võ Đức Linh, Tống Thành Long

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: nnnthao@ctump.edu.vn

(Nhận bài ngày 13 tháng 02 năm 2023)

Tóm tắt

Thành phần chính của lá xoài là mangiferin được biết đến có nhiều tác dụng như kháng virus, ung thư, tiểu đường, chống lão hoá, giảm đau... Bảo chế cao đặc lá xoài với mục tiêu nhiều hoạt chất và ít tạp chất nhằm gia tăng tỷ lệ hoạt chất, dễ dàng phối hợp bào chế các dạng chế phẩm. Thăm định phương pháp định lượng mangiferin đạt theo quy định ICH và điều chế cao đặc lá xoài bằng phương pháp ngâm lạnh trong ethanol 96%. 14 thí nghiệm thiết kế theo mô hình D-optimal được thực hiện và tối ưu hoá giai đoạn loại tạp chlorophyll trong cao bằng phần mềm BC Pharsoft OPT. Ba biến độc lập được chọn khảo sát gồm tỷ lệ dịch chiết và nước, thời gian và nhiệt độ làm lạnh. Hai biến phụ thuộc gồm tỷ lệ chlorophyll còn lại trong chế phẩm và tỷ lệ mangiferin mất đi so với cao ban đầu. Chọn công thức có các biến phụ thuộc càng nhỏ càng tốt. Kết quả nghiên cứu điều kiện tối ưu cho thấy tỷ lệ dịch chiết và nước 1:1,2, thời gian làm lạnh từ 15 phút, nhiệt độ làm lạnh từ 2°C thì tỷ lệ chlorophyll trong chế phẩm so với trước loại tạp 15,3%, tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu 20,2%. Hàm lượng hoạt chất tính theo mangiferin trong cao lá xoài đạt 342 mg/g cao. Quy trình loại tạp và tăng hàm lượng mangiferin trong bảo chế cao đặc lá xoài đã được nghiên cứu thành công, tăng khả năng phối hợp trong bào chế các dạng chế phẩm.

Từ khóa: *Chlorophyll, Mangiferin, Cây xoài (Mangifera indica L.), Điều kiện tối ưu, Phần mềm BC Pharsoft OPT.*

Summary

Optimizing the Process of Removing Impurities and Enriching the Content of Active Substances in the Preparation of Viscous Extract from Leaves of *Mangifera indica* L.

The main component of mango leaves is mangiferin, which is known to have many effects such as anti-viral, anti-cancerous, anti-diabetic, anti-aging, pain relief... The preparation of mango leaf extract often aims to have the least impurities and the most active substances in order to increase the percentage of active ingredients and to easily coordinate in preparing a dosage form. UV-Vis method was used to determine whether mangiferin content meets ICH regulation and the mango leaf extract was prepared by cold soaking in ethanol 96%. 14 experiments according to the D-optimal model were carried out to study and the preparation process at the stage of chlorophyll removal was optimized using BC Pharsoft OPT software. Three independent variables were selected including the ratio of extractive liquid/water, cooling time, and cooling temperature. Two dependent variables were the amount of chlorophyll left and the content of the mangiferin in the obtained extract compared to the original one. The results of optimizing the extractive process were as follows: the ratio between extractive liquid : water of 1:1.2; the cooling time of 15 minutes; the cooling temperature of 2°C; the amount of chlorophyll left was lower than 15.3%, while the content of the active markers was calculated as mg mangiferin equivalent was higher than 79.8% in the obtained extract compared to the original one. The amount of active ingredients gets over 342 mg/g of viscous extract.

Keywords: *Chlorophyll, Mangiferin, Mango tree (Mangifera indica L.), Optimal conditions, BC Pharsoft OPT software.*

1. Đặt vấn đề

Theo nhiều nghiên cứu đã được công bố, lá xoài có khả năng làm chậm hấp thu glucose ở ruột, tăng tổng hợp glycogen tại gan, giúp ổn định đường huyết sau ăn và đường huyết lúc đói. Thành phần chính của lá xoài là mangiferin, chiếm 20% trong lá khô được biết đến có nhiều tác dụng như chống oxy hoá, kháng virus, ung thư, tiểu đường, chống lão hoá, suy giảm miễn dịch, bảo vệ gan và giảm đau [1],[2],[3]. Ở Việt Nam, mangiferin đã được nghiên cứu phân lập thành công từ lá xoài [4]. Tuy nhiên, việc sử dụng dung môi methanol trong quá trình phân lập không phù hợp trong sản xuất công nghiệp [4]. Mangiferin khó tan trong nước nên để bào chế cao thường sử dụng dung môi ethanol [5]. Tuy nhiên, các tạp chất tan trong ethanol trong đó có chlorophyll với lượng khá lớn có thể gây ảnh hưởng không tốt đến chất lượng của chế phẩm, ảnh hưởng quá trình bảo quản chế phẩm. Hiện nay, các phương pháp cơ bản sử dụng để loại tạp

chất trong dịch chiết dược liệu không nhiều và cũng chưa được chú trọng ở Việt Nam, đặc biệt những phương pháp có khả năng ứng dụng trong thực tiễn sản xuất. Do đó, để tăng khả năng ứng dụng cao chiết lá xoài, việc tìm kiếm phương pháp đơn giản, hiệu quả để loại tạp chất trong dịch chiết và làm giàu hoạt chất trong cao lá xoài là rất cần thiết. Phương pháp kết tủa với nước đơn giản và khá hiệu quả đã được chứng minh trên thế giới (ứng dụng loại tạp chất trong dịch chiết còn tam thất) [6]. Mục tiêu chính của nghiên cứu là tối ưu hóa quy trình loại tạp chất (chủ yếu là chlorophyll) trong dịch chiết còn 96° từ lá xoài bằng phương pháp kết tủa với nước, qua đó làm tăng hàm lượng hoạt chất mangiferin trong cao đặc lá xoài.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Đối tượng: Mẫu lá xoài (*Mangifera indica* L.) sử dụng trong nghiên cứu là lá xoài cắt chu thu hái tại Ô Môn, Cần Thơ vào tháng 4 năm 2022.

Mẫu được định danh và lưu mẫu tại Bộ môn Dược liệu-Dược cổ truyền-Thực vật dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ. Mẫu sau khi thu hái được trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C và nghiền thành bột (độ ẩm 8,60%).

Hoá chất và dung môi: Chất chuẩn mangiferin (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS WS.0111280.01, hàm lượng 97%). Ethanol 96% và nước cất (Việt Nam). Tất cả các nguyên liệu, hóa chất sử dụng đều đạt tiêu chuẩn trong dược dụng và trong kiểm nghiệm.

Thiết bị, máy móc: UV-Visible Spectrophotometer (model UV - 1700) (Shimadzu Corp, Nhật), máy ly tâm (Hettich Mikro 220R, Trung Quốc), Vortex (TalBoys, Trung Quốc), tủ lạnh Samsung 507 lít RT50H6631SL/SV (Thái Lan), bể siêu âm 22 lít WUC-D22H Witeg (Đức), máy đo độ ẩm hồng ngoại AND MX-50 (Nhật Bản), tủ sấy Memmert model UNB 500 (Đức).

Nơi nghiên cứu: Khoa Dược, trường Đại Học Y Dược Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thẩm định phương pháp định lượng mangiferin: Thẩm định theo quy định của ICH [7] các chỉ tiêu sau: độ chọn lọc, tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác.

Phương pháp xác định hàm lượng mangiferin trong cao

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10 mg mangiferin chuẩn, hòa tan trong ethanol-nước (1:1), bổ sung thể tích đến 100 mL, lắc đều được dung dịch 100 µg/mL.

- Dung dịch chuẩn: Pha loãng chuẩn gốc với ethanol-nước (1:1) để tạo các dung dịch có nồng độ 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL. Đo mẫu ở bước sóng 367 nm.

- Mẫu trắng: Ethanol-nước (1:1).

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g cao, cho 90 mL ethanol-nước (1:1) vào hoà tan bằng sóng siêu âm trong 20 phút, bổ sung thể tích đủ 100 mL, lắc đều. Ly tâm lấy dịch. Lấy chính xác 1 mL dịch trong sau ly tâm cho vào bình định mức 100 mL. Định mức tới vạch bằng ethanol-nước (1:1). Lắc đều, đo quang ở bước sóng 367 nm.

Hàm lượng mangiferin toàn phần (mg/g)=

$$\frac{C_{\text{thực}} \times V \times k}{m \times (100 - H) \times 1000} \times 100$$

Trong đó: $C_{\text{thực}}$ là nồng độ mangiferin toàn phần trong dung dịch thử (µg/mL). V là thể tích dung dịch thử (mL), k là hệ số pha loãng, m là khối lượng của cao (g), H là hàm ẩm của cao (%).

Thiết kế thực nghiệm

Tiến hành bào chế cao đặc lá xoài bằng phương pháp ngâm lạnh trong ethanol 96%. Khảo sát tối ưu hoá quy trình bào chế ở giai đoạn loại tạp chlorophyll trong cao. Quy trình

bào chế, loại tạp chlorophyll và thiết kế tối ưu hoá như sau:

Quy trình bào chế dịch chiết lá xoài dùng để khảo sát tối ưu hóa

- Ngâm lạnh 100 g bột lá xoài (được xác định độ ẩm dưới 10%, kích thước thô vừa) trong 1000 mL ethanol 96% trong 24 giờ (1 lần chiết).

- Gạn dịch chiết và ép bã. Gộp dịch chiết và dịch ép, lọc qua giấy lọc.

- Xác định nồng độ mangiferin và chlorophyll trong dịch chiết ban đầu.

- Tiến hành loại chlorophyll theo 14 quy trình thiết kế.

- Tiến hành định lượng hoạt chất mangiferin và chlorophyll sau khi loại tạp.

Quy trình loại tạp chlorophyll: Lấy 50 mL dịch chiết đã biết nồng độ mangiferin cho vào cốc, tiếp theo cho nước cất vào cốc chứa dịch chiết theo tỷ lệ nhất định (cả hai cùng ở nhiệt độ phòng), khuấy 5 phút, sau đó để lạnh ở nhiệt độ xác định trong ngăn đá tủ lạnh (điều chỉnh và theo dõi nhiệt độ mỗi 5 phút 1 lần trong thời gian làm lạnh, độ chênh lệch nhiệt độ cho phép là 0,5°C) trong thời gian xác định làm tủa chlorophyll. Tiến hành lọc mẫu, xác định độ màu và định lượng mangiferin.

Thiết kế tối ưu hoá quy trình loại tạp chlorophyll: Thiết kế 14 công thức khảo sát bằng phần mềm Design expert và tối ưu hóa công thức quy trình bằng phần mềm BC Pharsoft OPT. Theo dõi ảnh hưởng của ba yếu tố: tỷ lệ giữa dịch chiết và nước (x_1), thời gian để lạnh dịch (x_2) và nhiệt độ làm lạnh (x_3) tới hàm mục tiêu là tỷ lệ chlorophyll còn lại so với ban đầu (%) (y_1); tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu (%) (y_2). Điều kiện tối ưu hóa: y_1 (%) càng nhỏ càng tốt, y_2 (%) càng nhỏ càng tốt.

Cách tính y_1 và y_2 như sau :

Tỷ lệ chlorophyll còn lại so với ban đầu (%) = (khối lượng chlorophyll còn lại trong dịch chiết sau loại tạp/ khối lượng chlorophyll trong dịch chiết trước loại tạp) x 100.

Tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu (%) = (1 - (khối lượng mangiferin còn lại trong cao sau loại tạp/ khối lượng mangiferin trong cao trước loại tạp)) x 100.

Phương pháp xác định nồng độ mangiferin trong dịch chiết: Mẫu dịch chiết được pha loãng bằng hỗn hợp ethanol-nước (1:1). Đối với dịch chiết ban đầu thì lấy chính xác 1 mL dịch chiết pha loãng trong bình định mức 100 mL. Đối với dịch chiết sau loại tạp thì lấy chính xác 5 mL pha loãng trong bình định mức 20 mL, sau đó lấy chính xác 1 mL pha loãng tiếp trong bình định mức 20 mL. Nồng độ mangiferin trong dịch chiết được tính theo công thức:

Nồng độ mangiferin trong dịch chiết (mg/mL) = $\frac{C_{thực} \times k}{1000}$. Trong đó $C_{thực}$ là nồng độ mangiferin toàn phần trong dung dịch thử (μg/mL). k là hệ số pha loãng.

Phương pháp xác định độ màu chlorophyll: Màu của chlorophyll trong dung dịch được xác định bằng phương pháp đo quang tại bước sóng λ (645 nm). Từ đó tính ra được nồng độ chlorophyll. Phương trình đường chuẩn chlorophyll đo ở bước sóng 645 nm [8]: $\hat{y} = 0,643 \times x$. Trong đó x là nồng độ chlorophyll (μg/mL); y là độ hấp thụ ở bước sóng 645 nm. Phương trình có $R^2 = 0,999$.

Quy trình bào chế cao đặc lá xoài sau khi tối ưu

- Ngâm lạnh 100 g bột lá xoài (được xác định độ ẩm dưới 10%, kích thước thô vừa) trong 1000 mL ethanol 96% trong 24 giờ (1 lần chiết).
- Gạn dịch chiết và ép bã. Gộp dịch chiết và dịch ép, lọc qua giấy lọc.
- Tiến hành loại chlorophyll.
- Cô dịch chiết đã loại chlorophyll ở nhiệt độ 60°C trên bếp cách thủy tới thể cao đặc. Xác định độ ẩm cao đặc.
- Tiến hành định lượng hoạt chất mangiferin có trong cần.

Bảo quản cao đặc trong lọ kín, tránh ánh sáng.

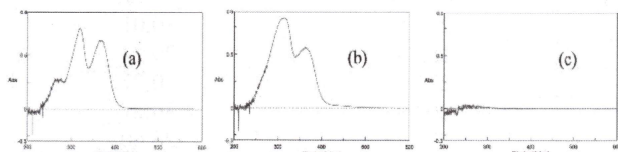
Kiểm nghiệm cao đặc: Kiểm tra một số chỉ tiêu chất lượng của cao đặc lá xoài (Cảm quan, mất khối lượng do làm khô, định tính, định lượng) [9].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thẩm định quy trình định lượng

Thẩm định theo quy định của ICH [7] các chỉ tiêu sau:

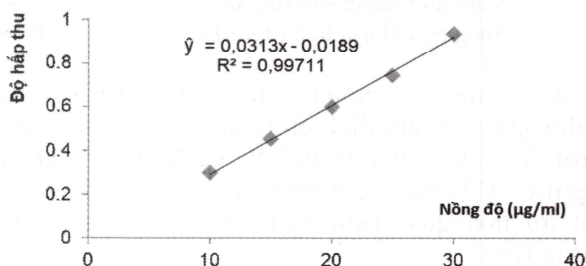
Độ chọn lọc đặc hiệu: Quét phổ mẫu chuẩn, mẫu thử, và mẫu trắng (quét qua đỉnh 367 nm). Hình ảnh phổ được thể hiện trong **Hình 1**. Tại bước sóng hấp thụ 367 nm không có đỉnh trên phổ đồ của mẫu trắng. Quy trình đạt tính đặc hiệu.



Hình 1. Phổ hấp thụ của mẫu chuẩn (a), mẫu thử (b) và mẫu trắng (c)

Tính tương thích hệ thống: Pha dung dịch mangiferin chuẩn có nồng độ 10 μg/mL từ dung dịch chuẩn gốc. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 367 nm. Thực hiện đồng thời 6 mẫu. Độ hấp thụ đo được là $0,3024 \pm 0,0011$ (RSD = 0,3774%).

Xác định khoảng tuyến tính: Thực hiện trên 5 mẫu chuẩn với nồng độ từ 10 - 30 μg/mL. Phương trình hồi quy tìm được là $\hat{y} = 0,0313x + 0,0189$ với $R^2 = 0,9971$. Sử dụng trắc nghiệm F cho thấy phương trình hồi quy tương thích ($p < 0,05$) và trắc nghiệm t cho thấy hệ số p có ý nghĩa ($p < 0,05$) và b_0 có ý nghĩa ($p < 0,05$) (**Hình 2**). Phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ đạt yêu cầu về tương quan tuyến tính.



Hình 2. Biểu đồ biểu diễn độ hấp thụ theo nồng độ mangiferin

Độ đúng: Sử dụng phương pháp thêm chuẩn, sau đó xác định độ thu hồi.

Tỷ lệ % tìm lại chuẩn được xác định theo công thức: Tỷ lệ % tìm lại = $\left(\frac{C_{tìm\ lại}}{C_{thêm\ vào}} \right) \times 100 = \left(\frac{C_{mẫu\ thử\ thêm\ chuẩn} - C_{mẫu\ thử}}{C_{thêm\ vào}} \right) \times 100$.

Thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn. Thêm lần lượt 1,0 mL dung dịch chuẩn có nồng độ là 10, 20 và 30 (μg/mL) vào các ống nghiệm chứa 1,0 mL dung dịch thử T. Mỗi mức nồng độ thêm làm 3 mẫu. Đo quang và dựa vào phương trình đường chuẩn, tính lượng chuẩn tìm lại. Kết quả tỷ lệ tìm lại của các mẫu nằm trong khoảng 99,47-103,05%. Trung bình đạt 100,44%, RSD = 0,7%.

Độ chính xác: Chuẩn bị các mẫu thử (n=6). Pha loãng các mẫu với ethanol-nước (1:1). Xác định nồng độ theo đường chuẩn. Kết quả đạt $341,91 \pm 1,04$ mg/g cao. RSD = 0,3% (**Bảng 1**).

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ chính xác

Mẫu	Độ hấp thụ	Nồng độ (μg/ml)	Độ pha loãng	Thể tích (ml)	Khối lượng cao (g)	Độ ẩm cao (%)	Hàm lượng mangiferin toàn phần (mg/g)	Hàm lượng trung bình ± SD (mg/g)
1	0,4611	15,3355	100	100	0,5003	10,3	341,72	341,91 ± 1,04
2	0,4559	15,1693	100	100	0,4928	10,3	343,17	
3	0,4591	15,2716	100	100	0,4981	10,3	341,8	

Mẫu	Độ hấp thu	Nồng độ (µg/ml)	Độ pha loãng	Thể tích (ml)	Khối lượng cao (g)	Độ ẩm cao (%)	Hàm lượng mangiferin toàn phần (mg/g)	Hàm lượng trung bình ± SD (mg/g)
4	0,4511	15,016	100	100	0,4886	10,3	342,62	
5	0,4703	15,6294	100	100	0,5123	10,3	340,11	
6	0,462	15,3642	100	100	0,5008	10,3	342,02	

Kết luận: Quy trình định lượng mangiferin trong cao lá xoài bằng phương pháp UV-Vis đạt yêu cầu cho phân tích định lượng chế phẩm.

3.2. Xác định nồng độ mangiferin và chlorophyll trong mẫu dịch chiết trước khi tối ưu hoá

Kết quả nồng độ mangiferin và chlorophyll trong mẫu dịch chiết lá xoài qua 3 lần đo được trình bày trong **Bảng 2**.

Bảng 2. Nồng độ mangiferin và chlorophyll trong dịch chiết lá xoài

Lần thử	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Nồng độ mangiferin (mg/mL)	2,787	2,880	2,531	2,732 ± 0,180
Nồng độ chlorophyll (µg/mL)	20,180	21,332	21,158	20,890 ± 0,621

Kết luận: Nồng độ mangiferin và chlorophyll trong dịch chiết lá xoài đo được lần lượt là 2,732 ± 0,180 mg/mL và 20,890 ± 0,621 µg/mL. Mẫu đã xác định nồng độ được đưa vào tối ưu hoá quy trình loại tạp để bào chế cao được liệu.

3.3. Thiết kế mô hình thực nghiệm

Sau khi chiết được liệu, tiến hành loại tạp trong dịch chiết được liệu và khảo sát các điều kiện loại tạp theo mô hình. Mô hình thực nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design Expert v7.0 và được trình bày trong **Bảng 3**.

Bảng 3. Thiết kế mô hình các quy trình

Quy trình	x ₁	x ₂ (phút)	x ₃ (°C)	Quy trình	x ₁	x ₂ (phút)	x ₃ (°C)
1	1:1	60	2	8	1:1,5	60	2
2	1,5:1	60	2	9	1,5:1	30	5
3	1,5:1	30	5	10	1,5:1	30	2
4	1:1	30	5	11	1:1,5	15	2
5	1:1,5	15	5	12	1:1	15	2
6	1:1	30	2	13	1:1	60	5
7	1:1,5	15	5	14	1,5:1	15	5

Trong đó x_i là các biến độc lập như sau:

x₁: Tỷ lệ dịch chiết: nước (thể tích:thể tích)

x₂: Thời gian làm lạnh (phút)

x₃: Nhiệt độ làm lạnh (độ C)

Theo mô hình trên, x₁ và x₂ được khảo sát ở 3

mức, x₃ được khảo sát ở 2 mức. Lượng dịch chiết lá xoài được giữ cố định. Các dịch chiết được xử lý theo quy trình và đo độ màu cũng như nồng độ mangiferin còn lại. Dữ liệu thực nghiệm theo mô hình trên được trình bày theo **Bảng 4**.

Bảng 4. Dữ liệu thực nghiệm về bào chế và kiểm nghiệm

Quy trình	x ₁	x ₂ (phút)	x ₃ (°C)	y ₁ (%)	y ₂ (%)
1	1:1	60	2	22,35	30,01
2	1,5:1	60	2	18,78	29,24
3	1,5:1	30	5	22,20	30,27
4	1:1	30	5	20,99	30,27
5	1:1,5	15	5	21,44	26,60
6	1:1	30	2	20,71	26,50
7	1:1,5	15	5	26,69	26,05
8	1:1,5	60	2	26,69	25,10
9	1,5:1	30	5	20,45	29,54
10	1,5:1	30	2	16,27	33,37
11	1:1,5	15	2	30,34	24,89
12	1:1	15	2	25,55	22,93
13	1:1	60	5	19,53	29,04
14	1,5:1	15	5	17,94	32,69

Ghi chú: x₁: Tỷ lệ dịch chiết: nước (thể tích:thể tích); x₂: Thời gian làm lạnh (phút); x₃: Nhiệt độ làm lạnh (độ C); y₁: Tỷ lệ chlorophyll còn lại so với ban đầu (%); y₂: Tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu (%).

Kết quả tối ưu hóa công thức

Dữ liệu thực nghiệm về bào chế và kiểm nghiệm trong **Bảng 3** được dùng làm đầu vào cho phần mềm BCPharsoft OPT để luyện mạng.

Luyện mạng thần kinh

Sử dụng thuật toán lan truyền ngược.

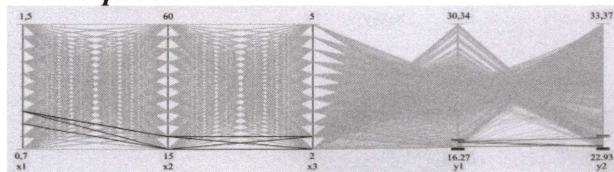
Số công thức luyện : 12

Số công thức thử : 2

Bảng 5. Giá trị R^2 thử và R^2 luyện của mô hình chọn lọc của công thức

	R^2 thử	R^2 luyện	Nhóm thử
y_1	0,86	0,82	8 và 14
y_2	0,99	0,88	11 và 14

Kết quả tối ưu hoá



Hình 3. Mối liên quan giữa biến độc lập và biến phụ thuộc khi tiến hành tối ưu hoá quy trình loại tạp với khoảng đạt được của y_1 từ 16,27 - 17,27% và y_2 từ 22,93 - 23,93%

Bảng 6. Kết quả thực nghiệm và dự đoán bởi phần mềm BCPharsoft OPT

Tính chất sản phẩm	Dự đoán	Kiểm chứng	Giá trị p
Tỷ lệ chlorophyll còn lại so với ban đầu (%)	16,5%	15,3 ± 1,4%	0,21
Tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu (%)	23,1%	20,2 ± 2,5%	0,12

Phân tích phương sai 2 yếu tố không lặp (bằng phần mềm MS-Excel 2003) cho thấy kết quả dự đoán và kết quả kiểm chứng không khác nhau về mặt thống kê ($p > 0,05$).

Sau khi loại tạp, dịch chiết được cô bay

Kết quả được thể hiện trong **Hình 3** cho thấy khi x_1 có tỷ lệ từ 1 : 1,06 đến 1 : 1,2, x_2 có giá trị từ 15 đến 17 phút, x_3 từ 2 đến 2,3°C thì lượng chlorophyll còn lại với tỷ lệ 16,27-17,27% so với lượng chlorophyll ban đầu, còn lượng mangiferin mất đi có tỷ lệ dưới 23,9% so với lượng mangiferin ban đầu.

Kết quả tối ưu hóa bởi phần mềm thông minh BCPharsoft OPT bao gồm các thông số tối ưu của các thành phần công thức và giá trị dự đoán của các tính chất sản phẩm được tóm tắt như sau:

Thông số tối ưu:

x_1 (Tỷ lệ dịch chiết: nước) = 1: 1,2 (thể tích:thể tích)

x_2 (Thời gian làm lạnh) = 15 phút

x_3 (Nhiệt độ làm lạnh) = 2°C

Tính chất dự đoán:

y_1 (Tỷ lệ chlorophyll còn lại so với ban đầu (%)) = 16,5%

y_2 (Tỷ lệ mangiferin mất đi so với ban đầu (%)) = 23,1%

Kiểm chứng thực nghiệm

Thực hiện kiểm chứng trên 3 lô (100 g/lô) sử dụng các giá trị biến độc lập đã được tối ưu bởi phần mềm BCPharSoft OPT.

Bảng 7. Kết quả định lượng hàm lượng mangiferin trong cao đặc

Lô	Độ hấp thu trung bình (n=3)	Nồng độ trung bình (µg/mL) (n=3)	Độ pha loãng	Thể tích (mL)	Khối lượng cao trung bình (g) (n=3)	Độ ẩm cao (%) (n=3)	Hàm lượng mangiferin toàn phần (mg/g) (n=3)	Hàm lượng trung bình ± SD (mg/g) (n=9)
1	0,4626	15,3823	100	100	0,4968	11,2	348,68	341,74 ± 6,29
2	0,4587	15,2588	100	100	0,4971	10,3	342,23	
3	0,4553	15,1512	100	100	0,4999	9,34	334,31	

Bảng 8. Kết quả kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng của cao đặc lá xoài

Chỉ tiêu	Kết quả
Hình thức cảm quan	Cao màu nâu hơi ánh xanh, đặc quánh, mùi đặc trưng, vị đắng
Mất khối lượng do làm khô	10,3%. Đạt theo quy định của ĐCVN V đối với cao đặc
Định tính	Đúng (bằng SKLM có vết trùng với vết của mangiferin chuẩn)
Định lượng	341,7 mg/g lượng mangiferin trong cao đặc

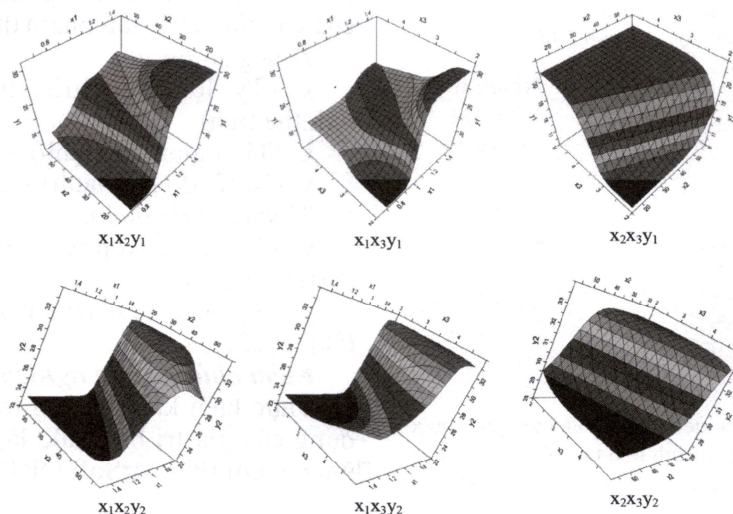
4. Bàn luận

Để gia tăng nồng độ hoạt chất trong các dịch chiết được liệu thì vấn đề cần bản nhất là tìm phương pháp loại tạp hiệu quả. Mangiferin là

hoạt chất chính trong lá xoài tan tốt trong ethanol cao độ. Tuy nhiên, khi chiết hoạt chất này từ lá xoài bằng ethanol 96% thì đồng thời tạp chlorophyll cũng hoà tan theo một lượng khá lớn.

Do đó, việc nghiên cứu loại tạp chlorophyll là cần thiết để tăng tỷ lệ hàm lượng hoạt chất trong cao [6],[8]. Trong nghiên cứu này để tăng hàm lượng hoạt chất trong cao, quá trình loại tạp chlorophyll được nghiên cứu tối ưu hoá quy trình để thu được kết quả loại tạp được nhiều mà vẫn giữ được lượng hoạt chất trong dịch chiết dẫn đến cao được giàu hàm lượng hoạt chất hơn.

Với kết quả nghiên cứu tối ưu lượng chlorophyll loại đi hơn 80% so với lượng tan vào dịch chiết dẫn đến hàm lượng hoạt chất trong cao đạt được hơn 342 mg/g cao (đã trừ ẩm), cao hơn gấp đôi so với kết quả chưa loại tạp là 148 mg/g cao (đã trừ ẩm) và cao hơn so với đạt được của nhiều nghiên cứu đã công bố (M. Magesh Kumara và cs. (2018)) [10].



Hình 4. Mối liên quan nhân quả giữa các cặp biến độc lập x đến biến phụ thuộc y_1, y_2

Phân tích mối liên quan nhân quả giữa biến độc lập và biến phụ thuộc trong khoảng khảo sát cho thấy tỷ lệ nước so với dịch chiết trong khoảng 0,8 đến 1,2 thì lượng chlorophyll còn lại thấp, trong khoảng từ 1,2 đến 1,5 thì tỷ lệ tăng dẫn đến chlorophyll còn lại nhiều hơn, thời gian làm lạnh trong khoảng khảo sát hầu như không ảnh hưởng đến các biến y, nhiệt độ làm lạnh càng thấp càng tốt trong quá trình loại chlorophyll (Hình 4).

5. Kết luận

Xác định được quy trình bào chế cao đặc lá xoài với các thông số: ethanol 96%, ngâm lạnh thời gian 24 giờ, loại tạp trong dịch chiết bằng

cách thay đổi đặc tính dung môi. Việc sử dụng nước loại chlorophyll trong nghiên cứu vừa kinh tế vừa không đưa chất khác vào dịch chiết vừa giúp các hoạt chất có hoạt tính sinh học trong dịch chiết được gia tăng nồng độ trong cao, tăng khả năng ứng dụng cao lá xoài. Kết quả nghiên cứu chỉ ra điều kiện tối ưu để tiến hành quá trình loại chlorophyll là tỷ lệ giữa dịch chiết : nước là 10:12 (v:v), nhiệt độ làm lạnh là 2°C, thời gian để lạnh ảnh hưởng không đáng kể, kết quả quy trình tối ưu chọn thời gian ngắn nhất là 15 phút. Hàm lượng hoạt chất tính theo mangiferin trong cao lá xoài đạt hơn 342 mg/g cao (đã trừ ẩm).

Tài liệu tham khảo

1. Imran M., Arshad M. S., Butt M. S., Kwon J. H., Arshad M. U., Sultan M. T. (2017). Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders, *Lipids in Health and Disease*, 16(84), 1-17.
2. Laulloo S. J., Bhowon M. G., Soyfoo S., Chua L. S. (2018), Nutritional and biological evaluation of leaves of *Mangifera indica* from Mauritius, *Journal of Chemistry*, 1-8.
3. Kulkarni V. M., Rathod V. K. (2018), Exploring the potential of *Mangifera indica* leaves extract versus mangiferin for therapeutic application, *Agriculture and Natural Resources*, 52(2), 155-161.
4. Lê Huyền Trâm, Nguyễn Văn Thông, Đinh Thị Thu Hiền (2020), Nghiên cứu phân lập hợp chất mangiferin từ lá cây xoài, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 140, 061-064.
5. Acosta J., Ilevilla I., Salomón S., Nuevas L., Romero A., Amaro D. (2016), Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry, *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 4(2), 49-53.
6. Daughenbaugh R. J., Bailey D. T., Gamble W. R., Dennis D., Gertenbach D. D. (2000), Process for removing impurities from natural product extracts, *The Patent Cooperation Treaty*, WO00/23090.
7. Sharma A., Sharma R. (2012), Validation of Analytical Procedures: A Comparison of ICH vs Pharmacopoeia (USP) vs FDA, *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 39-44.
8. Diosady L. L. (2005), Chlorophyll removal from edible oils, *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3, 81-88.
9. Bộ Y tế (2018), Dược điển Việt Nam V, NXB Y học, Hà Nội, PL9.
10. Anbalagan K., Kumara M. M., Ilango K., Mohankumar R., Priya R. L. (2019), Prelusive scale extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves: Assessing solvent competency, process optimization, kinetic study and diffusion modeling, *Industrial Crops and Products*, 140, 1-9.