

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO NƯỚC RỄ ĐAN SÂM GIÀU DANSHENSU

Trần Trọng Biên^{1,*}, Hoàng Thị Ngọc Anh², Bùi Thị Lan Phương^{1,3}

¹Đại học Dược Hà Nội; ²Đại học Đại Nam; ³Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia

*Email: trantrongbien@gmail.com

(Nhận bài ngày 10 tháng 3 năm 2022)

Tóm tắt

Danshensu là một hoạt chất quan trọng trong cao nước rễ đan sâm với các tác dụng dược lý đa dạng. Trong nghiên cứu này, một quy trình đơn giản và hiệu quả để chiết xuất cao nước rễ đan sâm giàu danshensu ở quy mô phòng thí nghiệm được xây dựng với các điều kiện: dược liệu được thái lát mỏng (dày 0,2-0,5 cm) và sắc với nước, pH 11, nhiệt độ 90-95°C, chiết 2 lần (5 giờ và 3 giờ), tỷ lệ dung môi/dược liệu (mL/g) lần lượt là 10/1 và 5/1. Cao khô thu được bằng phương pháp phun sấy có dạng bột màu nâu vàng, hàm ẩm 4,13%, hàm lượng danshensu là 2,82%. Hiệu suất chiết cao dược liệu và hiệu suất chiết danshensu lần lượt là 42,13% và 1,28% tính theo khối lượng dược liệu khô. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu xa hơn về hoạt chất danshensu, một acid phenolic đặc biệt trong đan sâm.

Từ khóa: *Danshensu, Đan sâm, Cao dược liệu, Quy trình, Acid phenolic.*

Summary

Preparation of Danshen Root Water Extract Enriched in Danshensu

Danshensu is a very important bioactive marker in danshen root water extract with various pharmacological activities. In this study, a simplified and highly efficient process for preparing Danshen root water extract enriched in danshensu was established on a laboratory scale by using decoction method with following conditions: Danshen roots in thin slices form (0.2-0.5 cm thick), pH 11, temperature 90 - 95°C, two extraction cycles (5h and 3h), solvent/material ratio (mL/g) for each cycle was 10/1 and 5/1, respectively. The dry extract obtained by spray drying method was brown-yellowish powder with moisture content of 4.13% and danshensu content of 2.82%. The yields of dry extract and danshensu were 42.13% and 1.28% calculated on the weight of dried roots, respectively. This is the promise for further studies on danshensu, a special phenolic acid of danshen roots.

Keywords: *Danshensu, Danshen, Extract, Process, Phenolic acid.*

1. Đặt vấn đề

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) là một dược liệu đặc biệt khi chứa hai nhóm hoạt chất quan trọng có tính tan khác nhau gồm acid phenolic thân nước và tanshinon thân dầu [1]. Do đó, có nhiều loại cao rễ đan sâm khác nhau như cao giàu acid phenolic, cao giàu tanshinon và cao hỗn hợp giàu cả hai nhóm hoạt chất. Mỗi sản phẩm có những đặc trưng riêng về chất lượng và ứng dụng cho những mục đích khác nhau. Trong đó, cao nước rễ đan sâm (chứa chủ yếu các acid phenolic) đã được ứng dụng trong bào chế nhiều dạng thuốc [2].

Danshensu (acid salvianic A, tanshinol) (**Hình 1**) là một trong những acid phenolic quan trọng trong rễ đan sâm với hàm lượng rất thấp (0,029 - 0,127% [3],[4]) nhưng có tác dụng dược lý đa dạng như chống oxy hóa, dọn gốc tự do, chống viêm, chống kết tập tiểu cầu và huyết khối, bảo vệ tim mạch và mạch máu não [5],[6]. Trước khi phát hiện ra danshensu vào đầu những năm 1980, các nhà khoa học mới chỉ chú ý nhiều đến nhóm

hoạt chất tanshinon (tanshinon IIa, cryptotanshinon...) thân dầu trong rễ đan sâm do màu đỏ đặc trưng của chúng. Hậu tố “su” trong danshensu có nghĩa là “thành tố”, hàm ý danshensu là đơn vị cấu tạo nên nhiều hoạt chất khác trong rễ đan sâm. Danshensu có đặc tính dược động học ưu việt hơn so với các acid phenolic khác và nó được dùng làm chất đánh dấu trong các nghiên cứu về dược động học và kiểm soát chất lượng nhiều dạng bào chế từ cao nước rễ đan sâm [2],[7]. Cao đan sâm giàu danshensu thể hiện tác dụng chống oxy hóa và giãn động mạch vành tốt hơn các loại cao đan sâm khác [4]. Hiện nay, danshensu đang được nghiên cứu sâu với hy vọng trở thành một dược chất (Active Pharmaceutical Ingredient, API) [8]. Đồng thời mới chỉ có ít nghiên cứu điều chế cao rễ đan sâm giàu danshensu sử dụng các thiết bị phức tạp như chiết vi sóng, chiết áp lực [4],[9]. Dù vậy, hiệu suất chiết và/hoặc hàm lượng danshensu trong cao còn thấp. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát và xây dựng được

quy trình đơn giản chiết xuất cao nước rễ đan sâm giàu danshensu quy mô phòng thí nghiệm.

2. Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu, thiết bị

Nguyên liệu dùng cho nghiên cứu là rễ cây đan sâm thu hái tại Hà Giang. Mẫu cây đan sâm được giám định tên khoa học là *Salvia miltiorrhiza* Bunge (số phiếu giám định 44/2018) tại Trường Đại học Dược Hà Nội. Natri danshensu chuẩn (hàm lượng 98,00%, lô PRF9101703) từ Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Trung Quốc). Acetonitril (ACN), acid formic (tiêu chuẩn HPLC).

Thiết bị: Nồi chiết inox có gia nhiệt, máy phun sấy Buchi Mini Sprayer B191 (Thụy Sĩ). Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Shimadzu SIL-20AHT (Nhật Bản) với detector mảng diod SPD-M20A. Cột sắc ký RP C₁₈ InertSustain® (250 × 4,6 mm, 5 μm).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết xuất và phun sấy: Cân 5 g dược liệu vào bình nón 100 mL, thêm nước RO và chiết xuất bằng phương pháp ngâm theo các điều kiện khảo sát, hỗn hợp chiết được ly tâm, lọc và phân tích HPLC. Sử dụng thiết kế đơn biến với các thông số: kích thước dược liệu (KTDL), pH, nhiệt độ chiết, tỷ lệ dung môi/dược liệu (DM/DL, mL/g), thời gian chiết và số lần chiết. Khi một thông số được khảo sát, các thông số khác được cố định (**Hình 3**). Hiệu suất chiết danshensu = $C \times V \times 100 / m$ (%), trong đó: C là nồng độ danshensu trong dịch chiết (mg/mL), V là thể tích dịch chiết (mL), m là khối lượng dược liệu (mg). Ở mẻ 100 g dược liệu, dịch chiết được điều chỉnh về pH 2-3 bằng HCl 5%, lọc trong, tinh chế, cô quay chân không (60°C, 500 mbar) đến còn 200 mL và phun sấy trên máy phun sấy Buchi Mini Sprayer B191 (Thụy Sĩ) với các điều kiện: nhiệt độ đầu vào 150°C, nhiệt độ đầu ra 80 - 85°C, áp lực quạt gió (aspirator) 100%, tốc độ

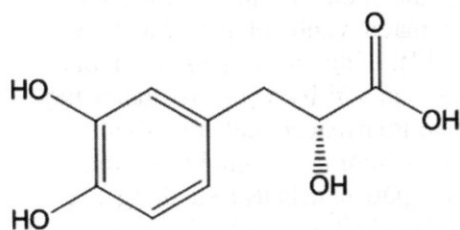
bơm dịch 8 mL/phút, lưu lượng khí nén 600 L/h, đường kính súng phun 0,7 mm.

Phương pháp định lượng: Phương pháp HPLC với điều kiện: cột pha tĩnh RP C₁₈ InertSustain® (250 × 4,6 mm, 5 μm), pha động ACN và acid formic 0,1%: 0-7 phút: 10→22% ACN, 7-10 phút: 22→28% ACN, 10-20 phút: 28→35% ACN, 20-25 phút: 35→10% ACN và 25-30 phút: 10% ACN, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μL, nhiệt độ cột 25°C, detector DAD tại bước sóng 280 nm [10]. Mẫu chuẩn danshensu được pha trong nước cất, khoảng tuyến tính từ 2-40 μg/mL với R² = 0,9999. Mẫu thử được liệu: Cân chính xác khoảng 0,400 g bột rễ đã rây qua rây 0,25 mm (hàm ẩm 9,87%) vào bình nón 100 mL, thêm chính xác 20 mL nước RO, cân xác định khối lượng bình rồi chiết siêu âm trong 2 giờ. Để nguội, cân lại và bổ sung khối lượng mất đi bằng nước RO. Điều chỉnh về pH 2-3 bằng HCl 5%, lọc qua màng 0,45 μm. Mẫu thử dịch chiết, cao khô: Pha loãng hoặc hòa tan một lượng mẫu thử trong nước cất để nồng độ danshensu nằm trong khoảng tuyến tính, lọc qua màng 0,45 μm. Nồng độ danshensu trong mẫu thử tính theo phương pháp so sánh điểm với mẫu chuẩn.

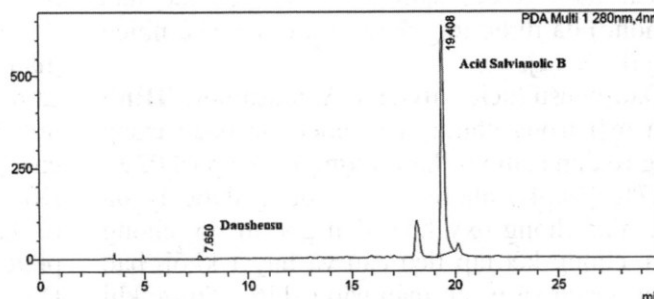
3. Thực nghiệm và kết quả nghiên cứu

3.1. Kiểm nghiệm dược liệu

Rễ đan sâm có các đặc điểm phù hợp với mô tả trong Dược điển Việt Nam 5 (ĐVN 5) [1] và có hàm lượng danshensu trung bình là 0,11 ± 0,005% tính theo dược liệu khô kiệt. Hàm lượng này thấp và tương tự như các công bố khác [3],[4]. Điều này cho thấy, cần nghiên cứu kỹ các điều kiện chiết xuất nhằm tăng hiệu suất chiết danshensu và từ đó tăng hàm lượng danshensu trong cao đan sâm. Sắc ký đồ HPLC kiểm nghiệm rễ đan sâm cho thấy, trong nhóm hoạt chất acid phenolic thì acid salvianolic B với thời gian lưu (t_R) khoảng 20 phút chiếm tỷ lệ lớn nhất, danshensu (t_R~7,5 phút) chiếm tỷ lệ rất ít (**Hình 2**).



Hình 1. Công thức cấu tạo của danshensu



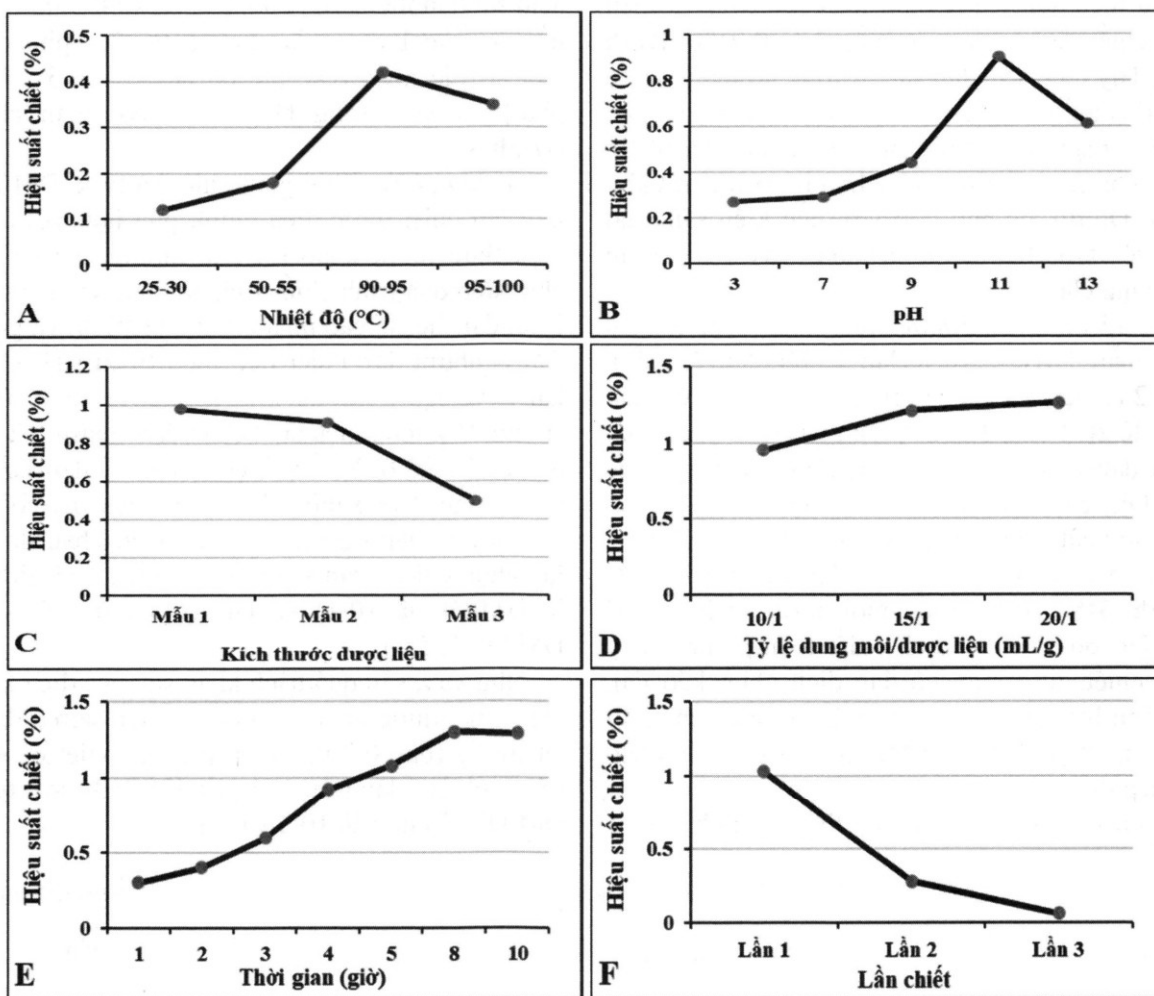
Hình 2. Sắc ký đồ HPLC kiểm nghiệm danshensu trong rễ đan sâm

3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố kỹ thuật đến quá trình chiết xuất

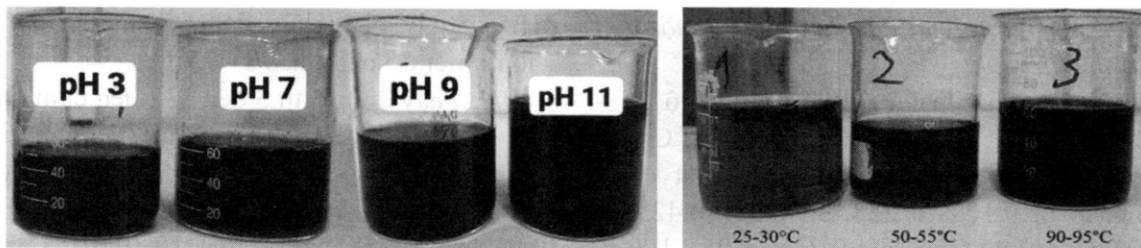
Nhiệt độ: Khảo sát ở 4 mức nhiệt độ 25 - 30°C, 50 - 55°C, 90 - 95°C và 95 - 100°C cho thấy, tăng nhiệt độ làm tăng hiệu suất chiết danshensu từ 0,12% ở 25 - 30°C lên 0,42% ở 90 - 95°C, sau đó giảm còn 0,35% ở 95 - 100°C (**Hình 3A**). Cảm quan dịch chiết cũng thay đổi rõ rệt theo nhiệt độ (**Hình 4**, phải). Điều này có thể giải thích do tăng nhiệt độ làm tăng tính thẩm dung môi, tăng khả năng hòa tan hoạt chất, đồng thời tăng khả năng thủy phân các acid phenolic khác để tạo danshensu [4]. Tuy nhiên ở điều kiện nhiệt độ cao (95 - 100°C) và

pH cao gây phân hủy danshensu. Do đó, lựa chọn nhiệt độ chiết là 90 - 95°C.

pH: Thay đổi pH từ 3 đến 13 (điều chỉnh bằng HCl 5% hoặc NaOH 10% sau mỗi 30 phút trong quá trình chiết) nhận thấy, hiệu suất chiết danshensu tăng dần từ pH 3 (0,27%) đến pH 11 (0,91%), sau đó giảm ở pH 13 (0,61%) (**Hình 3B**). Cảm quan dịch chiết cũng thay đổi rõ rệt theo pH (**Hình 4**, trái). Một phần nguyên nhân có thể do pH tăng làm tăng phản ứng thủy phân các acid phenolic khác tạo thành danshensu [9]. Ở pH 13, hiệu suất chiết danshensu giảm có thể do bị phân hủy trong điều kiện kết hợp với nhiệt độ cao. Do đó, lựa chọn điều kiện chiết xuất ở pH 11.



Hình 3. Ảnh hưởng của các yếu tố kỹ thuật đến hiệu suất chiết danshensu từ rễ đan sâm. (A) nhiệt độ (dược liệu dạng lát mỏng dày 0,2-0,5 cm, chiết 1 lần, 2 giờ, tỷ lệ DM/DL=10/1, pH 11), (B) pH (dược liệu dạng lát mỏng dày 0,2-0,5 cm, 90-95°C, chiết 1 lần, 4 giờ, tỷ lệ DM/DL=10/1), (C) KTDL (90-95°C, pH 11, chiết 1 lần, 4 giờ, tỷ lệ DM/DL=10/1), (D) tỷ lệ DM/DL (90-95°C, chiết 2 lần×4 giờ/lần, pH 11), (E) thời gian chiết (90-95°C, chiết 1 lần, tỷ lệ DM/DL=15/1, pH 11), (F) số lần chiết (90-95°C, pH 11, lần 1: 5 giờ và tỷ lệ DM/DL=10/1, lần 2: 3 giờ và tỷ lệ DM/DL=5/1, lần 3: 1 giờ và tỷ lệ DM/DL=5/1).



Hình 4. Cầm quan dịch chiết ở các pH khác nhau (chiết ở nhiệt độ 90 - 95°C, trái) và nhiệt độ khác nhau (chiết ở pH 11, phải)

Kích thước dược liệu: Khảo sát 3 mẫu gồm mẫu 1 (bột qua rây 3 mm), mẫu 2 (lát mỏng dày 0,2-0,5 cm) và mẫu 3 (khúc dài 1-2 cm) cho thấy: hiệu suất chiết danshensu tăng khi giảm KTDL, mẫu 1 cho hiệu suất chiết cao nhất (0,98%), mẫu 3 cho hiệu suất chiết thấp nhất (0,50%) và hiệu suất chiết danshensu với mẫu 2 là 0,91% (**Hình 3C**). Tuy nhiên, rễ đan sâm trương nở mạnh và rã mịn do ảnh hưởng của dung môi, nhiệt độ và pH. Mẫu 1, mặc dù có hiệu suất chiết danshensu cao nhất, nhưng quá trình xử lý hỗn hợp chiết rất khó khăn. Do đó, để phù hợp với điều kiện sản xuất thực tế, dược liệu dạng lát mỏng dày 0,2-0,5 cm được lựa chọn.

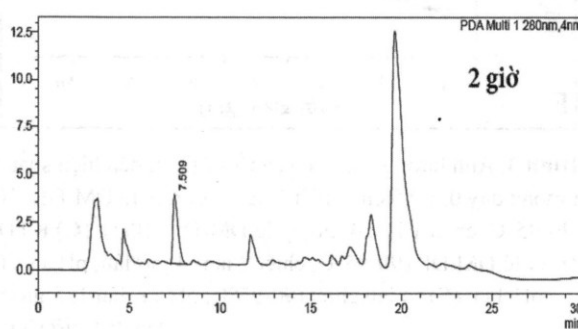
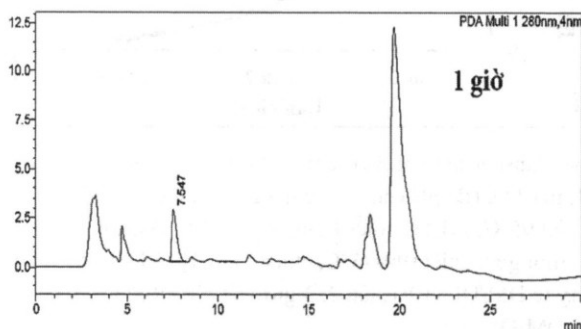
Tỷ lệ dung môi/dược liệu: Khảo sát 3 mẫu gồm mẫu 1 (tỷ lệ 10/1 (lần 1: 7/1, lần 2: 3/1)), mẫu 2 (tỷ lệ 15/1 (lần 1: 10/1, lần 2: 5/1)) và mẫu 3 (tỷ lệ 20/1 (lần 1: 10/1, lần 2: 10/1)). Hiệu suất chiết danshensu có xu hướng tăng khi tăng tỷ lệ DM/DL, cao nhất ở mẫu 3 (tỷ lệ 20/1) (1,26%) và thấp nhất ở mẫu 1 (tỷ lệ 10/1) (0,95%). Mẫu 2 (tỷ lệ 15/1) có hiệu suất chiết danshensu là 1,21% (**Hình 3D**). Với dung môi nước, nếu tỷ lệ DM/DL quá lớn thì dịch chiết loãng, khó xử lý dịch chiết, thời gian cô đặc dịch chiết kéo dài, gây ảnh hưởng đến độ ổn định của hoạt chất. Vì vậy, lựa chọn tỷ lệ DM/DL là 15/1 cho các khảo sát tiếp theo.

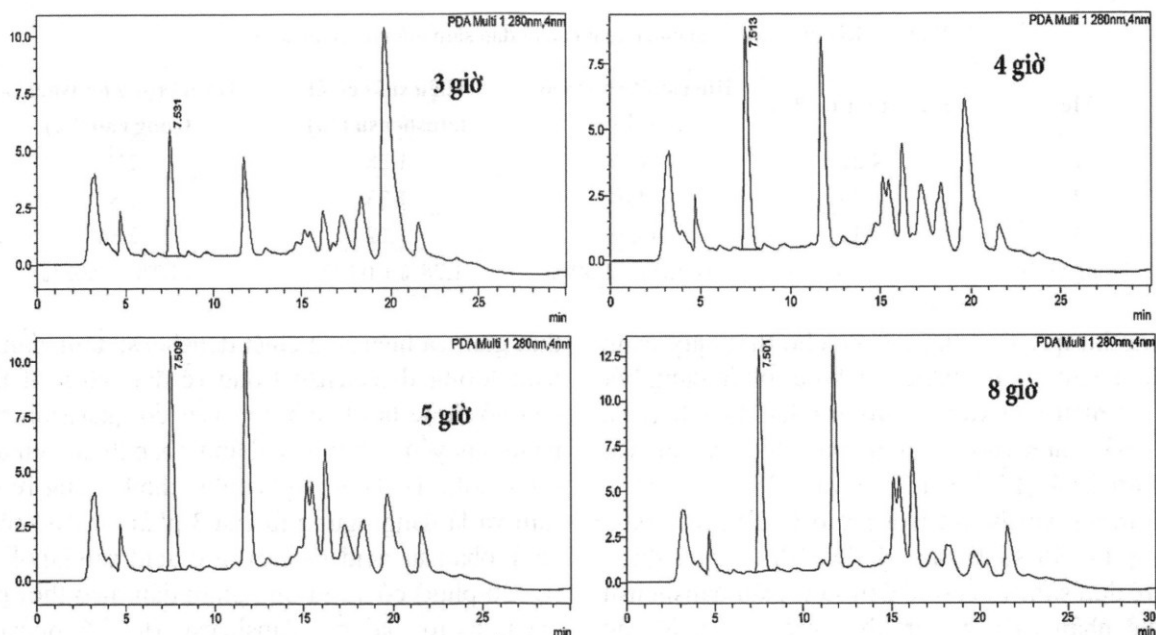
Thời gian chiết: Thay đổi thời gian chiết từ 1

đến 10 giờ nhận thấy hiệu suất chiết danshensu tăng dần và đạt cân bằng lúc 8 giờ (**Hình 3E**). Đặc biệt, quan sát tổng thể dịch chiết bằng sắc ký đồ HPLC có thể thấy rõ có sự chuyển hóa giữa các thành phần trong dịch chiết, trong đó: pic acid salvianolic B ($t_R \sim 20$ phút) có xu hướng giảm dần, ngược lại pic danshensu ($t_R \sim 7,5$ phút) và một số pic khác (các pic có $t_R \sim 12, 16,5$ và 22 phút) có xu hướng tăng theo thời gian chiết (**Hình 5**).

Số lần chiết: Thời gian chiết và tỷ lệ DM/DL mỗi lần chiết được điều chỉnh phù hợp với điều kiện thực tế và khảo sát ảnh hưởng của số lần chiết đến quá trình chiết xuất nhận thấy: hiệu suất chiết danshensu cao nhất ở lần 1 (1,03%) và giảm dần ở những lần chiết tiếp theo (hiệu suất chiết lần 2 và lần 3 tương ứng là 0,28% và 0,06%) (**Hình 3F**), tổng hiệu suất chiết danshensu ở 2 lần đầu chiếm 95,62% tổng hiệu suất chiết danshensu ở cả 3 lần. Đồng thời, thời gian chiết dài có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của hoạt chất, do đó lựa chọn chiết 2 lần với điều kiện lần 1 (5 giờ, tỷ lệ DM/DL là 10/1) và lần 2 (3 giờ với tỷ lệ DM/DL là 5/1).

Như vậy, sau quá trình khảo sát, các điều kiện chiết xuất được lựa chọn gồm: rễ đan sâm ở dạng lát mỏng (dày 0,2-0,5 cm), pH 11, nhiệt độ 90-95°C, chiết 2 lần (lần 1: 5 giờ, lần 2: 3 giờ), tỷ lệ DM/DL lần lượt là 10/1 và 5/1.



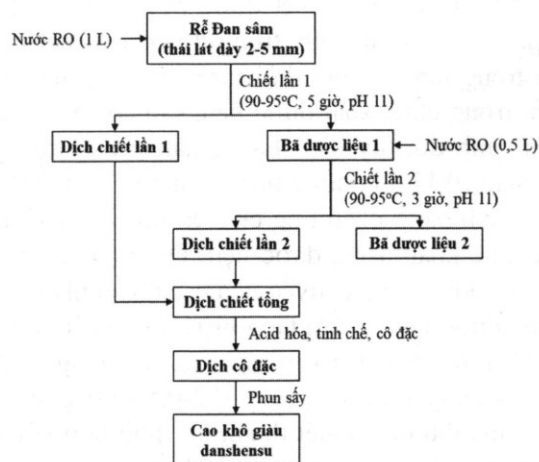


Hình 5. Sắc ký đồ HPLC theo dõi quá trình chiết xuất cao đơn sâm giàu danshensu theo thời gian chiết

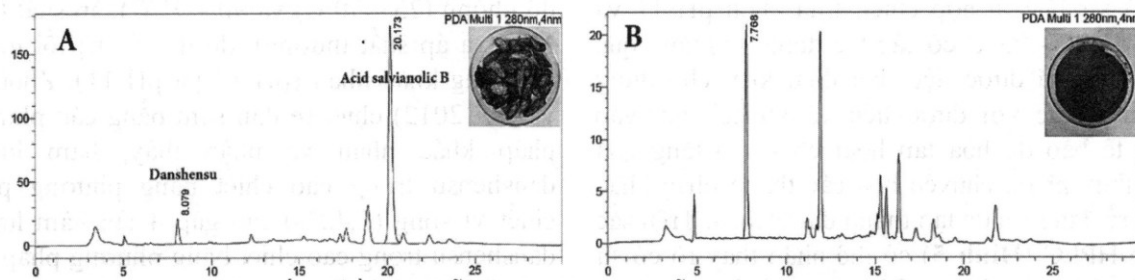
3.3. Quy trình chiết xuất cao rễ đơn sâm giàu danshensu

Tiến hành theo sơ đồ **Hình 6**, cụ thể: rễ đơn sâm (hàm ẩm 9,87%, hàm lượng danshensu 0,11%) được thái lát dày 0,2-0,5 cm. Cân 100 g dược liệu vào bình cầu 2 L, thêm 1 L nước, điều chỉnh đến pH 11 bằng NaOH 10% và chiết xuất trong 5 giờ ở 90 - 95°C, khuấy trộn 150 vòng/phút, pH được điều chỉnh sau mỗi 30 phút. Sau thời gian chiết, ly tâm, gạn thu dịch chiết lần 1. Bã dược liệu được thêm 0,5 L nước và chiết xuất lần 2 trong 3 giờ với điều kiện như trên. Gộp các dịch chiết, điều chỉnh về pH 2-3 bằng HCl 10%, khuấy đều, ly tâm loại tủa. Dịch trong được tinh chế, cô quay chân không (60°C, 500 mbar) đến còn 200 mL và phun sấy trên máy phun sấy Buchi Mini Sprayer B191 (Thụy Sĩ) với các điều kiện: nhiệt độ đầu vào 150°C, nhiệt độ đầu ra 80 - 85°C, áp

lực quạt gió (aspirator) 100%, tốc độ bơm dịch 8 mL/phút, lưu lượng khí nén 600 L/h, đường kính súng phun 0,7 mm.



Hình 6. Sơ đồ tóm tắt quy trình chiết xuất cao rễ đơn sâm giàu danshensu



Hình 7. Sắc ký đồ HPLC rễ đơn sâm (A) và cao rễ đơn sâm giàu danshensu (B)

Bảng 1. Kết quả quy trình chiết xuất cao rễ đan sâm giàu danshensu (n=3)

Mẻ	Hàm ẩm cao (%)	Hiệu suất chiết cao (%)	Hiệu suất chiết danshensu (%)	Hàm lượng danshensu trong cao (%)
1	4,21	41,58	1,28	2,76
2	3,76	44,04	1,33	2,87
3	4,42	40,78	1,22	2,84
Trung bình	4,13% ± 0,28%	42,13% ± 1,39%	1,28% ± 0,04%	2,82% ± 0,05%

Lặp lại quy trình trên 3 mẻ cho thấy quy trình ổn định, cao giàu danshensu thu được là dạng bột khô to màu nâu vàng, hàm ẩm 4,13% ± 0,28%, hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết danshensu lần lượt là 42,13% ± 1,39% và 1,28% ± 0,04%, hàm lượng danshensu trong cao là 2,82% ± 0,05% (**Bảng 1**). So sánh sắc ký đồ HPLC giữa dược liệu rễ đan sâm và cao rễ đan sâm giàu danshensu có thể nhận thấy rõ sự khác biệt về tỷ lệ các thành phần, đặc biệt là các hoạt chất acid phenolic (**Hình 7**).

4. Bàn luận

Trong rễ đan sâm, các thành phần tan trong nước đa dạng và chiếm phần lớn (ĐDVN 5 quy định dược liệu có tỷ lệ chất chiết được trong nước ≥ 35%, tỷ lệ chất chiết được trong cồn ≥ 15% [1]). Các acid phenolic trong đó có danshensu dễ tan trong nước, đồng thời nước là dung môi phổ biến trong chiết xuất dược liệu, sẵn có và an toàn. Bên cạnh đó, tuy hàm lượng danshensu trong rễ rất thấp (0,11%) nhưng hoạt chất này có thể được tạo thành bằng phản ứng chuyển hóa của các acid phenolic khác trong dược liệu. Do đó, dùng nước để tạo môi trường chuyển hóa các thành phần khác trong dược liệu, nhằm tăng hiệu suất chiết và tăng hàm lượng danshensu trong cao. Sử dụng rễ đan sâm ở dạng lát mỏng (dày 0,2-0,5 cm) giúp quá trình lọc thu dịch chiết thuận lợi, phù hợp với sản xuất thực tế do trong quá trình chiết nóng với dung môi nước ở pH kiềm, nếu bột quá mịn thì cellulose trong rễ bị thủy phân mạnh, dược liệu trương nở và bã mịn làm dịch chiết nhớt, gây khó khăn khi lọc và xử lý hỗn hợp chiết. Lựa chọn pH 11 và nhiệt độ 90 - 95°C có các tác dụng: (1) tăng quá trình phân rã dược liệu, tạo điều kiện cho dung môi tiếp xúc với dược liệu và khuếch tán vào trong tế bào để hòa tan hoạt chất; (2) tăng quá trình thủy phân, chuyển hóa các thành phần khác trong rễ đan sâm để tạo thành danshensu. Trên sắc ký đồ HPLC (**Hình 5**) có thể nhận thấy rõ có sự chuyển hóa các thành phần trong dịch chiết theo

thời gian và hiệu suất chiết danshensu tăng dần. Vì hàm lượng danshensu trong rễ đan sâm rất thấp nên nó được tạo thành chủ yếu do quá trình thủy phân, chuyển hóa từ các thành phần khác như acid salvianolic B (là acid phenolic chính trong rễ đan sâm và là dạng ngưng tụ của 3 phân tử danshensu và 1 phân tử acid cafeic). Píc acid salvianolic B ($t_R \sim 20$ phút) có xu hướng giảm dần theo thời gian chiết, ngược lại píc danshensu ($t_R \sim 7,5$ phút) và một số píc khác (các píc có $t_R \sim 12, 16,5$ và 22 phút) có xu hướng tăng theo thời gian chiết. Theo tìm hiểu tài liệu thì đây là các chất chuyển hóa của acid salvianolic B trong điều kiện chiết [4]. Ở các điều kiện nhiệt độ và pH cao hơn (ví dụ nhiệt độ hồi lưu của nước $\sim 100^\circ\text{C}$) như tài liệu [3] và pH 13 như tài liệu [9]), sắc ký đồ dịch chiết cho thấy sự phân hủy đáng kể của các acid phenolic trong đó có danshensu. Do đó, để phù hợp với điều kiện sản xuất thực tế và độ ổn định của các acid phenolic trong quá trình chiết xuất, thời gian chiết (tổng 8 giờ, lần 1: 5 giờ, lần 2: 3 giờ) và số lần chiết (2 lần) được khảo sát và điều chỉnh.

Lam F. F. Y. và cs. (2007) chiết rễ đan sâm bằng phương pháp chiết hồi lưu với nước trong 2 giờ cho hiệu suất chiết danshensu là 0,33% [3]. Chen R. và cs. (2008) chiết rễ đan sâm bằng phương pháp chiết áp lực ở nhiệt độ phòng, áp suất 300 MPa, dung môi ethanol 80%, pH 13 trong 16 giờ cho hiệu suất chiết danshensu là 0,465% [9]. Các điều kiện chiết xuất ở nghiên cứu này khác với nghiên cứu của chúng tôi về dung môi (ethanol 80% và nước), nhiệt độ (nhiệt độ phòng (25 - 30°C) và 90 - 95°C), áp suất (300 MPa và áp suất thường), do đó giá trị tối ưu về pH cũng khác nhau (pH 13 và pH 11). Zhou X. và cs. (2012) chiết rễ đan sâm bằng các phương pháp khác nhau và nhận thấy, hàm lượng danshensu trong cao chiết bằng phương pháp chiết vi sóng (1,42%) cao gấp 4 lần hàm lượng danshensu trong cao chiết bằng phương pháp hồi lưu (0,34%) [4]. Trong nghiên cứu của chúng tôi,

hiệu suất chiết danshensu và hàm lượng danshensu trong cao đan sâm thu được lần lượt là 1,28% và 2,82% (**Bảng 1**), cao hơn các nghiên cứu trên [3],[4],[9]. Chuyên luận Acid phenolic toàn phần đan sâm (*Salvia total phenolic acid*) trong Dược điển Trung Quốc 2015 mô tả quy trình chiết rễ đan sâm bằng phương pháp ngâm nóng với dung môi nước ở nhiệt độ 80°C. Dịch chiết được tinh chế bằng phương pháp “kết tủa bằng cồn” cho sản phẩm giàu các acid phenolic, trong đó acid salvianolic B chiếm tỷ lệ lớn nhất ($\geq 5\%$), danshensu chiếm tỷ lệ ít hơn đáng kể [2]. Ngược lại, trong nghiên cứu này, bằng cách so sánh sắc ký đồ HPLC giữa dược liệu và cao nước rễ đan sâm có thể nhận thấy rõ sự khác biệt: rễ đan sâm chứa hàm lượng lớn acid salvianolic B, hàm lượng danshensu rất thấp trong khi đó cao

nước rễ đan sâm chứa hàm lượng lớn danshensu và một số chất chuyển hóa khác, hàm lượng acid salvianolic B rất thấp (**Hình 7**).

5. Kết luận

Quy trình đơn giản chiết xuất cao nước rễ đan sâm giàu danshensu đã được nghiên cứu ở quy mô phòng thí nghiệm với các điều kiện lựa chọn là: dược liệu dạng lát mỏng dày 0,2 - 0,5 cm, pH 11, nhiệt độ 90 - 95°C, chiết 2 lần (lần 1: 5 giờ, lần 2: 3 giờ), tỷ lệ DM/DL lần lượt là 10/1 và 5/1. Cao giàu danshensu có dạng bột khô hơi màu nâu vàng, hàm ẩm 4,13%, hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết danshensu lần lượt là 42,13% và 1,28%, hàm lượng danshensu trong cao là 2,82%. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về danshensu.

Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam 5 (2018), Đan sâm (Rễ và thân rễ), 1152-1154.
2. Chinese Pharmacopoeia (2015) *Salvia total phenolic acids*, 520-522.
3. Lam F. F. Y., Yeung J. H. K., Chan K. M., Or P. M. Y. (2007), Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels, *Vascular Pharmacology*, 46(4), 271-277.
4. Zhou X., Shun W., Hui L., Yan D., Pui M., Pou S., Penelope M. Y. O., Jia M., Francis F. Y. L., Simon M. Y. L., George P. H. L., Siu K. K., Ho P. H., Yiu W. K., John H. K. Y. (2012), Danshensu is the major marker for the antioxidant and vasorelaxation effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water-extracts produced by different heat water-extractions, *Phytomedicine*, 19(14), 1263-1269.
5. Yan X. Overview of modern research on danshen, G. Du, J. Zhang, Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) in Medicine, Volume 2, Springer, Germany, 2014.
6. Zhang N., Zou H., Jin L., Wang J., Zhong M. F., Huang P., Gu B. Q., Mao S. L., Zhang C., Chen H. (2010), Biphasic effects of sodium danshensu on vessel function in isolated rat aorta, *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(4), 421-428.
7. Lu T., Yang J., Gao X., Chen P., Du F., Sun Y., Wang F., Xu F., Shang H., Huang Y., Wang Y., Wan R., Liu C., Zhang B., Li C. (2008), Plasma and urinary tanshinol from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiotonic pills, a cardiovascular herbal medicine, *Drug Metabolism & Disposition*, 36(8), 1578-1586.
8. Yang M., Chen T., Wang L., Chen L., Li J., Di L. (2018), High dispersed phyto-phospholipid complex/TPGS 1000 with mesoporous silica to enhance oral bioavailability of tanshinol, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 170, 187-193.
9. Chen R., Zhang S., Zhang Y., F. Meng (2008), Ultrahigh pressure extraction of Danshensu, *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 24(1), 291-295.
10. Trần Trọng Biên, Bùi Thị Thúy Luyện (2020), Xây dựng phương pháp định lượng danshensu trong cao nước rễ đan sâm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược liệu*, 25(4), 236-241.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 3/2022 (Trang 149 - 157)

NGHIÊN CỨU HỆ HAI PHA THÂN NƯỚC ỨNG DỤNG TRONG ĐIỀU CHẾ CAO LÁ CHÈ XANH GIÀU CATECHIN

Phạm Thị Hiền^{1,3}, Nghiêm Thị Minh², Trần Trọng Biên^{3,*}

¹Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia; ²Cao đẳng y tế Hà Nội; ³Đại học Dược Hà Nội

*Email: trantrongbien@gmail.com

(Nhận bài ngày 18 tháng 5 năm 2022)

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, một hệ hai pha thân nước (aqueous two-phase system, ATPS) dựa trên alcol/muối được phát triển và ứng dụng trong tinh chế cao lá chè xanh. Qua quá trình sàng lọc, hệ ethanol/(NH₄)₂SO₄ cho thấy khả năng tinh chế tốt nhất. Do đó, giản đồ pha hệ ethanol/(NH₄)₂SO₄ được xây dựng và các thông số tinh chế như tỷ lệ thành phần của hệ ATPS, pH,