

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,

thời gian chiết phân bố, nồng độ và bản chất dịch chiết được nghiên cứu. Áp dụng trong tinh chế cao chiết nước lá chè xanh, ATPS gồm 17% ethanol, 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 3-4, nồng độ dịch chiết 8%, thời gian chiết phân bố 10 phút cho kết quả khả quan khi so sánh với hệ chiết phân bố lỏng lỏng cổ điển ethyl acetat/nước xet về hàm lượng EGCG trong cao tinh chế (29,2% và 33,2%).

Từ khóa: Hệ hai pha thân nước, Alcol/muối, Tinh chế, Cao lá chè xanh, Chiết phân bố lỏng lỏng.

Summary

Applying the Aqueous Two Phase System in Preparation of Catechin-Rich Green Tea Leaf Extract

In this research, an aqueous two-phase system (ATPS) based on alcohol/salt was developed and applied in purification of green tea extract. Of all alcohol/salt systems screened, ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ showed the best performance. Thus, its phase diagram was firstly constructed and then purification parameters, namely, the compositions of ATPS, pH, shaking time, concentration and nature of extract were investigated. When applied in purification of green tea aqueous crude extract, method based on ATPS composed of ethanol 17%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25%, pH 3-4, shaking time 10 mins, extract concentration 8% showed preferable results in comparison with conventional liquid liquid extraction method based on ethyl acetate/water in regard of the EGCG content in purified extract (29.2% vs 33.2%).

Keywords: Aqueous two-phase system, Alcohol/salt, Purification, Green tea extract, Liquid liquid extraction.

1. Đặt vấn đề

Chè (Trà, *Camellia sinensis* L.) là một trong những đồ uống phổ biến nhất ở Việt Nam và trên thế giới do hương vị đặc trưng và các tác dụng sinh học quan trọng của các hợp chất polyphenol (chủ yếu là các catechin) trong lá như chống oxy hóa, chống dị ứng, chống viêm, kháng khuẩn, chống ung thư [1]. Trong các catechin chè xanh, epigallocatechin gallat (EGCG) là thành phần có hàm lượng lớn nhất và có tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất. Có nhiều phương pháp tinh chế có thể áp dụng trong điều chế cao dược liệu giàu hoạt chất [2]. Mỗi phương pháp đều có những ưu nhược điểm riêng, trong đó chiết phân bố lỏng lỏng vẫn là phương pháp phổ biến và được áp dụng trong rất nhiều quy trình tinh chế các dịch chiết. Tuy nhiên, các hệ chiết phân bố lỏng lỏng cổ điển sử dụng các dung môi hữu cơ ít phân cực như ether, *n*-hexan, dicloromethan, cloroform, *n*-butanol, ethyl acetat bộc lộ nhiều nhược điểm như: chiết nhiều lần, sử dụng nhiều dung môi hữu cơ độc hại, cần thiết bị chuyên dụng, khó kiểm soát quy trình, nguy cơ mất an toàn lao động và tồn dư dung môi trong sản phẩm cuối.

Trong xu hướng công nghệ sản xuất “xanh”, kỹ thuật chiết phân bố lỏng lỏng sử dụng hệ hai pha lỏng thân nước (aqueous two-phase system, ATPS) đã được nghiên cứu và ứng dụng trong lĩnh vực chiết xuất dược liệu theo 2 hướng chính: làm dung môi tinh chế hoặc dung môi chiết xuất và tinh chế đồng thời. Các ưu điểm của ATPS gồm: sử dụng dung môi an toàn, dễ kiểm, tiết kiệm thời gian sản xuất, cải thiện đáng kể độ tinh khiết của sản phẩm, cho hiệu suất thu hồi cao [3],[4],[5],[6]. Tuy nhiên ở Việt Nam, chưa có nhiều nghiên cứu về ứng dụng ATPS trong các

quy trình chiết xuất. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: Xây dựng được quy trình điều chế cao lá chè xanh giàu catechin sử dụng hệ hai pha thân nước alcol/muối.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị

Nguyên liệu:

Lá chè xanh tươi được thu hái tại Đại Từ, Thái Nguyên tháng 4/2018 và giám định tên khoa học tại bộ môn Thực vật, trường Đại học Dược Hà Nội. Nguyên liệu được rửa sạch, sấy khô ở 50°C và bảo quản trong 2 lần túi PE ở điều kiện phòng. EGCG chuẩn: hàm lượng 99,78%, lô MUST-17060113 (Chengdu Must Biological Technology Co., Ltd.).

Hóa chất: alcol (methanol, ethanol, isopropanol), muối (NaCl, KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, K_2HPO_4 , K_2CO_3 , Na_2CO_3), ethyl acetat, acid formic, acid acetic băng đạt tinh khiết hóa học. Methanol, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn HPLC.

Thiết bị: Nồi chiết inox có gia nhiệt, máy phun sấy Buchi Mini Sprayer B191 (Thụy Sĩ), máy đông khô Christ Alpha 1-LD. 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). Cân phân tích Mettler Toledo AB204-S (Mettler Toledo, Thụy Sĩ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sàng lọc ATPS: Các alcol mạch ngắn và các muối vô cơ được sàng lọc để lựa chọn ATPS phù hợp. Trong các ống nghiệm trong suốt, hòa tan chính xác một lượng muối trong nước cất, thêm từ từ từng giọt alcol vào dung dịch muối đến khi có sự tách pha, lắc đều và quan sát. Tiếp tục thêm

một lượng cao thô vào hệ alcol/muối, lắc hòa tan cao, để yên 30 phút và quan sát.

Xây dựng giản đồ pha hệ alcol/muối: Giản đồ pha hệ ethanol/muối được xây dựng bằng phương pháp điểm vân đục (cloud point method). Hòa tan chính xác một lượng muối trong nước cất, dùng micropipet cho từ từ từng giọt ethanol vào đến khi xuất hiện vân đục (dấu hiệu bắt đầu có sự tách pha) thì cân lại hệ trên cân phân tích, ghi lại chính xác khối lượng từng thành phần. Sau đó dùng micropipet thêm một lượng nước cho hệ trong trở lại. Lặp lại thao tác thêm ethanol đến điểm vân đục rồi lại thêm nước như trên để thu được các điểm vân đục với tỷ lệ muối, tỷ lệ alcol khác nhau. Mỗi cặp giá trị thành phần của hệ được biểu diễn bằng một điểm trên đồ thị, giản đồ pha được xây dựng thông qua tập hợp các điểm xác định được. Dữ liệu thực nghiệm được khớp theo các phương trình kinh nghiệm:

$$w_1 = \exp(a + bw_2^{0,5} + cw_2 + dw_2^2)$$

$$w_1 = a_1 \times e^{-w_2/b_1} + a_2 \times e^{-w_2/b_2} + c$$

Trong đó: w_1 , w_2 tương ứng là tỷ lệ khối lượng alcol và muối trong hệ; a , a_1 , a_2 , b , b_1 , b_2 , c , d là các hệ số của phương trình, được xác định dựa vào phương pháp bình phương tối thiểu. Đánh giá mô hình qua hệ số tương quan (R^2) và sai số trung bình bình phương gốc (Root Mean Square Error, RMSE).

Phương pháp điều chế cao thô

Cao thô nước: 200 g lá chè xanh được chiết 2 lần $\times$ 1400 mL nước/lần $\times$ 2 giờ/lần ở 80-85°C trong thiết bị chiết có khuấy trộn. Gộp các dịch chiết và cô loại dung môi dưới áp suất giảm (500 mbar, 70°C) đến khi còn 1/3 thể tích và phun sấy.

Cao thô ethanol 50%: 100 g lá chè được chiết 2 lần $\times$ 700 mL ethanol 50%/lần $\times$ 12 giờ/lần ở nhiệt độ phòng (~25°C) trong thiết bị chiết có khuấy trộn. Gộp các dịch chiết và cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm (500 mbar, 50°C) đến khi còn 1/3 thể tích và phun sấy.

Điều kiện phun sấy: máy phun sấy Buchi Mini Sprayer B191 (Thụy Sĩ), nhiệt độ đầu vào 140°C, nhiệt độ đầu ra 67 - 70°C, tốc độ bơm 30 - 35%, áp suất phun dịch 100%, áp suất khí nóng 400 - 600 mbar, áp suất khí âm -40 mbar.

Cao thô nước có hàm ẩm 3,4% $\pm$ 0,23%, hàm lượng EGCG 10,5% $\pm$ 0,3%. Cao thô ethanol 50% có hàm ẩm 3,7% $\pm$ 0,16%, hàm lượng EGCG 15,3% $\pm$ 0,5%. Thí nghiệm khảo sát quá trình tinh chế được tiến hành với mẫu

cao thô nước, mẫu cao thô ethanol 50% được dùng để so sánh.

Tinh chế cao thô bằng ATPS: Trong ống ly tâm 15 ml có nắp, thêm ATPS với các thành phần gồm: dịch chiết (hòa tan cao thô trong nước), muối và alcol với các tỷ lệ và nồng độ theo khảo sát. Lắc hỗn hợp bằng máy lắc Vortex để hòa tan cao thô, muối và trộn lẫn các pha để tạo sự phân bố chọn lọc của các thành phần trong hỗn hợp, sau đó để phân lớp. Để hỗ trợ quá trình tách pha, hệ được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút và thu lấy pha trên, tiếp tục thêm 2 phần thể tích ethanol tuyệt đối để loại muối trong pha trên (nếu có). Ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu lấy phần dịch, cô cách thủy còn 1/4 thể tích, thêm đồng lượng nước và đông khô với các điều kiện: tiền đông mẫu ở -70°C trong 12 giờ rồi đông khô 24 giờ trên máy Christ Alpha 1-LD (tiền đông -48 $\pm$ 2°C, áp suất 0,120 $\pm$ 0,02 mbar).

Tinh chế cao thô bằng hệ ethyl acetat/nước: 100 mL dịch chiết nồng độ 8% được lắc chiết phân bố với ethyl acetat 2 lần $\times$ 30 mL, mỗi lần lắc trong 10 phút, để phân lớp và gạn lấy pha trên (pha giàu ethyl acetat). Gộp các dịch tinh chế, cô quay chân không thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn lại nước và đông khô tương tự như trên.

Phương pháp định tính và định lượng EGCG

Định tính bằng sắc ký lớp mỏng: Bản mỏng silica gel 60F₂₅ được hoạt hóa ở 110°C trong 30 phút; dung môi khai triển: ethyl acetat: nước: acid formic: acid acetic băng (70:30:3:2, tt/tt), lắc đều, lấy lớp trên; chất chuẩn: EGCG chuẩn nồng độ 100 μ g/mL; phát hiện vết ở bước sóng 254 nm.

Định lượng bằng HPLC: Tham khảo các tài liệu [7], các điều kiện sắc ký gồm: Cột C18 InertSustain® (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m); pha động methanol - nước - acid phosphoric (20 : 79,9 : 0,1, tt/tt); tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 20 μ L; detector quang phổ tử ngoại bước sóng 280 nm. Mẫu chuẩn: Dung dịch chuẩn EGCG pha trong nước cất có nồng độ từ 5 đến 200 μ g/mL. Mẫu thử: Hòa tan một lượng mẫu thử bằng nước cất để được các dung dịch có nồng độ EGCG nằm trong khoảng tuyến tính, lọc qua màng 0,45 μ m. Nồng độ EGCG trong các mẫu thử được tính theo đường chuẩn.

Xử lý số liệu

Các kết quả được thể hiện dưới dạng Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n=3$) nếu không có giải thích gì thêm.

3. Thực nghiệm và kết quả

3.1. Sàng lọc hệ ATPS

Quá trình sàng lọc alcol và muối cho thấy hệ ATPS ethanol/ NaH_2PO_4 và ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thể hiện sự phân tách pha tốt, các hoạt chất catechin phân bố tốt lên pha trên (pha giàu alcol) và ổn định (Hình 1). Do đó, 2 hệ này tiếp tục được so sánh ở những phần tiếp theo.

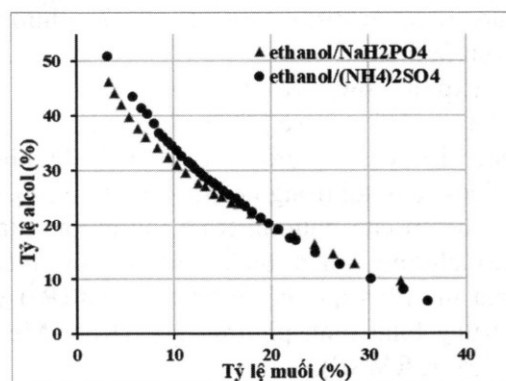
3.2. Xây dựng giản đồ pha

Giản đồ pha được xây dựng bằng phần mềm OriginLab 8 (Hình 2). Đường tách pha chia giản đồ pha thành 2 vùng: vùng dưới đường tách pha là hệ một pha đồng nhất và không có sự tách lớp, vùng trên đường tách pha là vùng có sự tách lớp hình thành hai pha bền vững với pha trên là pha giàu alcol và pha dưới là pha giàu muối. Đường tách pha càng gần gốc tọa độ biểu hiện các hệ dễ đạt được sự



Hình 1. ATPS tạo thành từ ethanol và các muối khác nhau (từ trái qua phải: NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, K_2HPO_4 , K_2CO_3 , Na_2CO_3)

tách pha ở những tỷ lệ muối và alcol ngược nhau (tỷ lệ muối thấp và tỷ lệ alcol cao và ngược lại). Đường tách pha càng xa gốc tọa độ biểu diễn các hệ đạt được sự tách pha ở những tỷ lệ muối và tỷ lệ alcol gần nhau. Các tỷ lệ thích hợp của alcol và muối ứng với các điểm nằm trong vùng 2 pha được lựa chọn cho các khảo sát ở những phần sau. Dữ liệu giản đồ pha thu được sau đó được khớp vào các phương trình thực nghiệm theo phương pháp bình phương tối thiểu nhờ phần mềm MATLAB 2017b, kết quả được thể hiện trong **Bảng 1**. Giá trị hệ số tương quan R^2 cao và RMSE nhỏ chứng tỏ dữ liệu thực nghiệm thu được có tính phù hợp cao với hai phương trình dự đoán, đồng thời phương trình $w_1 = \exp(a + bw_2^{0.5} + cw_2 + dw_2^2)$ mô tả chính xác hơn các dữ liệu thực nghiệm.



Hình 2. Giản đồ pha hệ ethanol/ NaH_2PO_4 và ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở 25°C

Bảng 1. Kết quả khớp dữ liệu đường tách pha

Phương trình $w_1 = \exp(a + bw_2^{0.5} + cw_2 + dw_2^2)$						
Hệ	a	b	c	d	R^2	RMSE
Ethanol/ NaH_2PO_4	4,5640	-0,4875	0,0533	-0,0011	0,9997	0,1791
Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,465	-0,3239	0,0199	-0,0011	0,9993	0,2857
Phương trình $w_1 = a_1 \times e^{-w_2/b_1} + a_2 \times e^{-w_2/b_2} + c$						
Hệ	a_1	a_2	b_1	b_2	c	R^2
Ethanol/ NaH_2PO_4	-350,6	50,59	0,036	17,88	2,92	0,9960
Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	177,6	-114,8	18,56	17,62	-4,00	0,9981
						RMSE
Ethanol/ NaH_2PO_4						0,7006
Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						0,4825

3.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tinh chế cao lá chè xanh

Ảnh hưởng của loại muối: Cho vào ống ly tâm có nắp 5 ml dịch chiết nồng độ 8%, 2,5 ml ethanol và 1,8 g muối ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc NaH_2PO_4). Xử lý mẫu để tinh chế thu được kết quả như **Hình 3A**:

hệ ethanol/ NaH_2PO_4 có tỷ lệ cao thu hồi lớn hơn (40,6% so với 35,4%) và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế thấp hơn so với hệ ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15,7% so với 22,4%). Hệ ethanol/ NaH_2PO_4 có tỷ lệ thể tích pha trên (V_t) và thể tích pha dưới (V_b) lớn hơn so với hệ ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,85 so với

0,55) nên tỷ lệ chất tan phân bố lên pha trên (pha giàu alcol) lớn hơn. Trong tình chế các dịch chiết bằng phương pháp chiết phân bố lỏng lỏng, tỷ lệ V_t/V_b thấp sẽ thuận lợi cho quá trình xử lý pha trên để thu sản phẩm do thể tích dịch tinh chế ít và nồng độ chất tan cao. Do đó, hệ ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được lựa chọn.

Ảnh hưởng của tỷ lệ muối: Cho vào ống ly tâm có nắp 5 ml dịch chiết nồng độ 8%, 2,5 ml ethanol và thay đổi lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong hệ từ 1,6 đến 2,8 g (tương ứng với tỷ lệ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong hệ từ 18 đến 28%). Xử lý mẫu để tinh chế thu được kết quả như **Hình 3B**: tăng tỷ lệ muối trong hệ làm tăng tỷ lệ cao thu hồi. Tuy nhiên, hàm lượng EGCG trong cao tinh chế giảm. Ảnh hưởng của tỷ lệ muối đến quá trình tinh chế có thể được giải thích do hiệu ứng “salting-out” của muối, tăng tỷ lệ muối làm tăng khả năng cạnh tranh của phân tử muối với các phân tử chất tan trong pha dưới (pha giàu muối) và phân tử alcol, hệ quả là alcol và chất tan bị đẩy lên pha trên (pha giàu alcol) làm tăng tỷ lệ cao thu hồi [4]. Ở những tỷ lệ muối cao (28%), tỷ lệ cao thu hồi lớn làm giảm hiệu quả của quá trình tinh chế cao thô do hàm lượng EGCG trong cao không được cải thiện đáng kể. Ở tỷ lệ muối là 25%, cao tinh chế có hàm lượng EGCG cao (20,6%) và tỷ lệ cao thu hồi cao (45,9%) nên được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ alcol: Cho vào ống ly tâm có nắp 5 ml dịch chiết nồng độ 8%, 2,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, thay đổi lượng ethanol thêm vào hệ từ 1,5 đến 3 mL (tương ứng với tỷ lệ ethanol trong hệ từ 12 đến 22%). Xử lý mẫu để tinh chế thu được kết quả như **Hình 3C**: tăng tỷ lệ ethanol trong hệ từ 13 đến 23% làm tăng tỷ lệ cao thu hồi và làm giảm hàm lượng EGCG trong cao tinh chế. Điều này có thể được giải thích dựa vào ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol thêm vào hệ đến các đặc tính của hệ như V_t , V_b , tỷ lệ V_t/V_b , nồng độ ethanol trong pha giàu alcol. Tăng tỷ lệ ethanol trong hệ làm tăng V_t và nồng độ ethanol trong pha giàu alcol, do đó lượng chất tan phân bố lên pha trên tăng, tỷ lệ cao thu hồi tăng. Tuy nhiên, tỷ lệ cao thu hồi tăng có thể làm hàm lượng EGCG trong cao tinh chế giảm khi tỷ lệ EGCG thu hồi giữ ở mức ổn định. Cân đối giữa 2 yếu tố tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế, tỷ lệ ethanol trong hệ là 17% được lựa chọn.

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết: Cho vào ống ly tâm có nắp cho 5 ml dịch chiết có nồng độ cao thô khác nhau, 2,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 2,0 ml ethanol. Xử lý mẫu để tinh chế thu được kết quả

ở **Hình 3D**: ở mức nồng độ dịch chiết thấp (4 và 8%), nồng độ dịch chiết ít ảnh hưởng đến tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế. Ở mức nồng độ dịch chiết cao hơn (12 và 16%), tăng nồng độ dịch chiết làm giảm tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế. Do đó, nồng độ dịch chiết 8% được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH: Ở điều kiện nồng độ dịch chiết 8%, tỷ lệ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25%, pH của hệ là 3,4. pH dịch chiết được điều chỉnh về các giá trị từ 3 đến 6 bằng dung dịch HCl 10% hoặc NaOH 10%. Kết quả ở **Hình 3E** chỉ ra rằng, khi pH của hệ trong khoảng 3-4, tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế thay đổi không đáng kể. Tăng pH của hệ lên 5 và 6 làm giảm hàm lượng EGCG trong cao. Điều này có thể giải thích do các hoạt chất trong cao lá chè xanh là các catechin có tính acid yếu, trong môi trường acid có $\text{pH} < \text{pKa}$, các catechin tồn tại phần lớn ở dạng phân tử nên dễ phân bố chủ yếu ở pha trên (pha giàu alcol ít phân cực hơn). Ngược lại, khi pH của hệ tăng, catechin tồn tại nhiều ở dạng ion hóa nên tăng nồng độ trong pha dưới (pha giàu muối), giảm nồng độ và sự phân bố trong pha giàu alcol, hệ quả là hàm lượng EGCG trong cao giảm. Trên cơ sở đó, pH tự nhiên của hệ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo và không cần điều chỉnh.

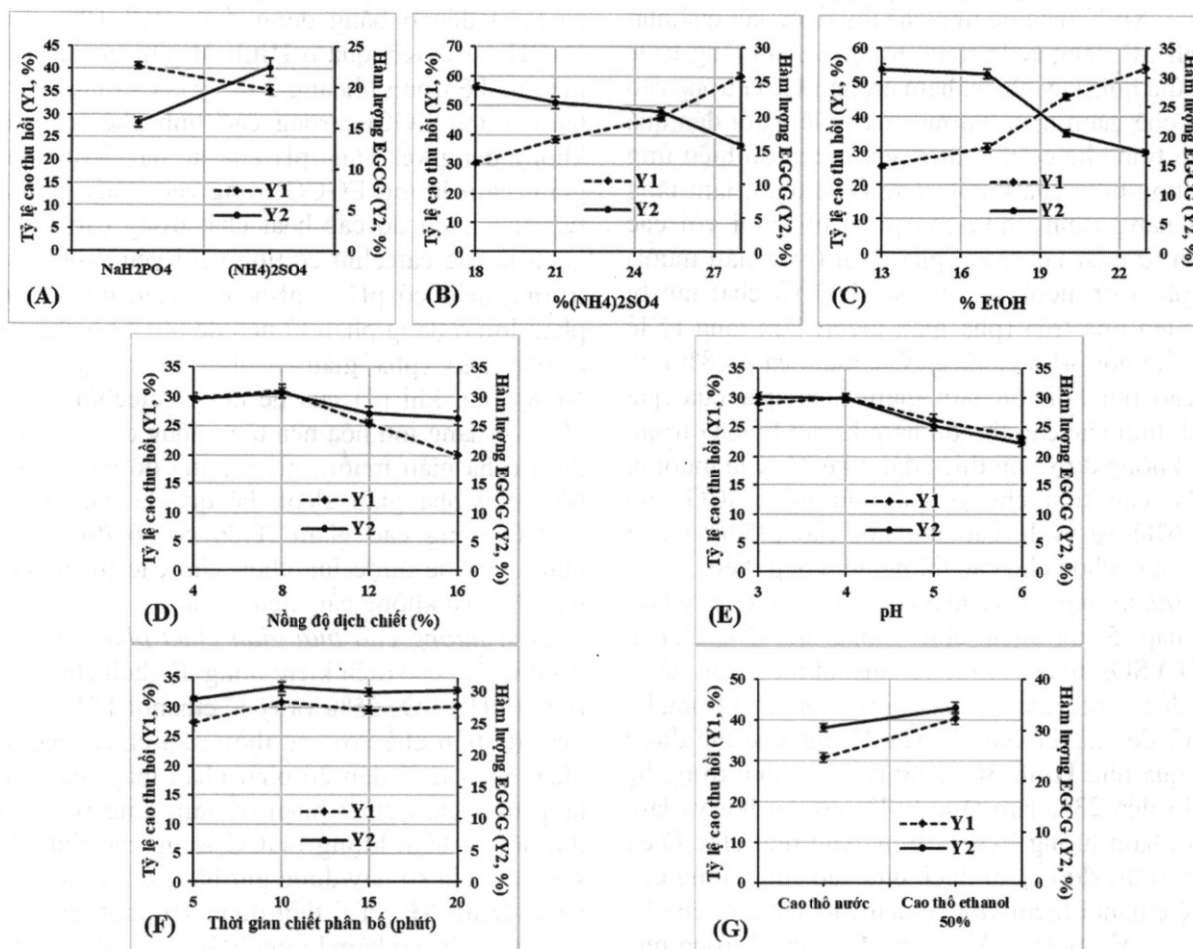
Ảnh hưởng của thời gian chiết phân bố: Với ATPS gồm các điều kiện: nồng độ dịch chiết 8%, tỷ lệ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25% và tỷ lệ ethanol 17%, xử lý mẫu để tinh chế với các thời gian chiết phân bố khác nhau từ 5 đến 20 phút nhận thấy: ban đầu, tăng thời gian chiết phân bố làm tăng tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế, sau đó 2 chỉ số này được giữ hằng định theo thời gian (**Hình 3F**). Tại thời điểm 10 phút, cao tinh chế thu được có hàm lượng EGCG là 30,6% và tỷ lệ cao thu hồi là 30,9%. Do đó, thời gian chiết phân bố được lựa chọn là 10 phút.

Ảnh hưởng của loại cao thô: Trong những điều kiện chiết xuất khác nhau như dung môi, nhiệt độ, sẽ thu được các dịch chiết và cao thô với các thành phần tạp chất, hoạt chất có bản chất, tỷ lệ khác nhau. Sự khác nhau này có thể ảnh hưởng đến quá trình tinh chế loại tạp chất trong dịch chiết và cao thô đó. Do vậy, với các điều kiện tinh chế bằng ATPS đã lựa chọn được, nghiên cứu thử nghiệm các loại cao thô ban đầu gồm cao nước (hàm lượng EGCG 10,5%) và cao ethanol 50% (hàm lượng EGCG 15,3%) để kiểm

tra khả năng tinh chế của ATPS ethanol/(NH₄)₂SO₄. Kết quả ở **Hình 3G** cho thấy, tinh chế bằng ATPS sử dụng cao thô ethanol 50% cho tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế cao hơn so với việc sử dụng cao thô nước. Mặc dù hàm lượng EGCG trong cao thô ethanol 50% lớn hơn cao thô nước, tỷ lệ tăng hàm lượng EGCG trong cao tinh chế so với cao thô nước lớn hơn tỷ lệ tăng hàm lượng EGCG trong trường hợp cao thô ethanol 50% (2,9 so với 2,2). Điều này chứng tỏ bản chất cao thô ảnh

hưởng đến quá trình tinh chế bằng ATPS và phương pháp tinh chế này hiệu quả với cao thô nước hơn là cao thô ethanol 50%, xét về tỷ lệ tăng hàm lượng hoạt chất trong cao.

Dựa vào các kết quả khảo sát trên, ATPS phù hợp cho quá trình tinh chế cao thô nước lá chè xanh được lựa chọn gồm: loại alcol là ethanol, loại muối là (NH₄)₂SO₄, nồng độ dịch chiết 8%, tỷ lệ muối 25%, tỷ lệ alcol 17%, pH 3-4, thời gian chiết phân bố 10 phút, hỗ trợ tách pha bằng cách ly tâm (tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút).

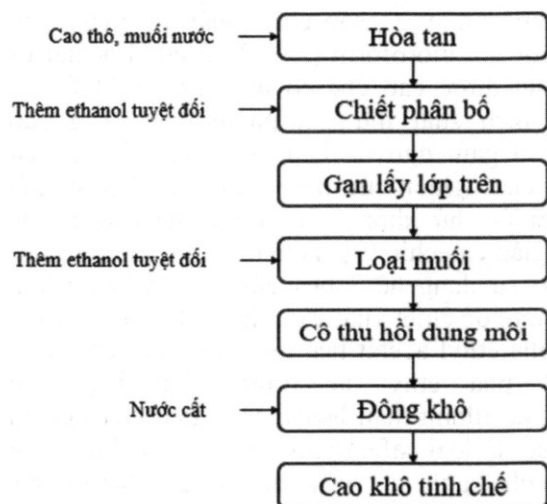


Hình 3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình tinh chế cao lá chè xanh. Loại muối (A), Tỷ lệ muối (B), Tỷ lệ ethanol (C), Nồng độ dịch chiết (D), pH (E), Thời gian chiết phân bố (F) và Loại cao thô (G)

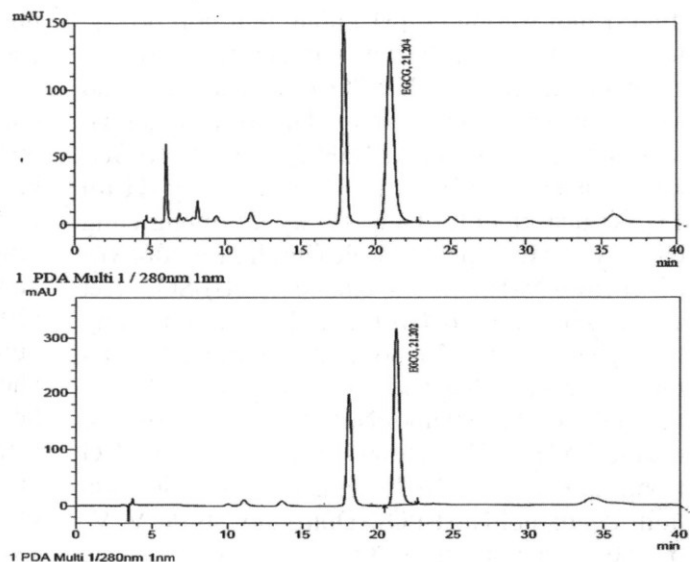
3.4. Ứng dụng ATPS tinh chế cao lá chè xanh

Tiến hành theo sơ đồ **Hình 4**, cụ thể như sau: hòa tan muối (NH₄)₂SO₄ (48 g) và cao thô (8 g) vào 100 mL nước cất, kiểm tra pH và điều chỉnh trong khoảng pH 3-4 (nếu cần). Chuyển pha nước vào bình gạn 250 mL, thêm ethanol tuyệt đối (40 mL), lắc chiết phân bố trong 10 phút và để phân lớp. Chiết lấy lớp trên (~ 50 mL), thêm 100 mL ethanol tuyệt đối, lắc đều 5 phút, để phân lớp và gạn lấy lớp trên, cô quay

chân không thu hồi ethanol dưới áp suất giảm đến khi còn khoảng 15 mL, thêm đồng lượng nước và đông khô trên máy Christ Alpha 1-LD với các điều kiện: tiền đông mẫu ở -70°C trong 12 giờ, đông khô 24 giờ ở điều kiện vận hành cố định của model 1-LD là nhiệt độ tiền đông -48 ± 2°C, áp suất 0,120 ± 0,02 mbar. Kết quả: tỷ lệ cao thu hồi là 32,2% ± 1,3%, hàm lượng EGCG trong cao tinh chế là 29,2% ± 0,9% (**Hình 5**).



Hình 4. Sơ đồ quy trình tinh chế cao lá chè xanh bằng ATPS



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC cao thô (trên) và cao tinh chế (dưới) bằng ATPS

3.5. So sánh ATPS và hệ chiết phân bố lỏng lỏng cổ điển

Hệ chiết phân bố lỏng lỏng cổ điển ethyl acetat/nước được sử dụng phổ biến trong tinh chế dịch chiết lá chè xanh do tính phân bố chọn lọc cao của các catechin trong pha giàu ethyl acetat. Do đó, hệ này được sử dụng để so sánh với ATPS sử dụng ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kết quả cho thấy, hệ ATPS ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có tỷ lệ cao thu hồi lớn hơn (32,2% so với 25,4%) và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế thấp hơn so với hệ ethyl acetat/nước (29,2% so với 33,2%). Bên cạnh đó, hệ ethyl acetat/nước có tỷ lệ EGCG thu hồi lớn hơn hệ ATPS ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (92,33% so với 77,89%). Sự khác nhau này do tính phân bố chọn lọc của các thành phần trong cao thô trong các pha: ethyl acetat là dung môi hữu cơ ít phân cực, có tính chọn lọc hòa tan và phân bố cao với các catechin, do đó hàm lượng EGCG trong cao tinh chế và tỷ lệ EGCG thu hồi lớn hơn khi so sánh với hệ ATPS ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tuy nhiên, kết quả này cũng cho thấy triển vọng của hệ ATPS ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong tinh chế cao thô nước lá chè xanh.

4. Bàn luận

Trong các dung môi cơ bản dùng để chiết xuất dược liệu, nước là dung môi phổ biến nhất vì rẻ và an toàn. Tuy nhiên, nước là một dung môi không chọn lọc nên dịch chiết nước thường lẫn nhiều tạp chất (chủ yếu các tạp chất thân nước như polysaccharid, gôm, chất nhầy, pectin...), đặc biệt khi chiết nóng. Để tinh chế các dịch chiết nước, có thể sử dụng một số phương pháp như

kết tủa (thay đổi dung môi, nhiệt độ, pH,...), hấp phụ, trao đổi ion, kết bông, tách màng, chiết phân bố lỏng lỏng [2]. Chiết phân bố lỏng lỏng là một kỹ thuật truyền thống và được sử dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu cũng như thực tế sản xuất. Cơ bản, phương pháp dựa trên độ tan và sự phân bố chọn lọc của thành phần trong dịch chiết trong các pha lỏng không trộn lẫn. Ethyl acetat là dung môi có tính chọn lọc cao với các catechin lá chè xanh và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu [8],[9]. Tuy nhiên nhược điểm của phương pháp này là việc sử dụng nhiều dung môi hữu cơ độc hại. Trong xu hướng công nghệ chiết xuất “xanh”, hệ hai pha lỏng thân nước, đặc biệt là hệ alcol/muối được nghiên cứu và ứng dụng khá hiệu quả trong nhiều quy trình chiết xuất và tinh chế.

Kết quả sàng lọc hệ alcol/muối cho thấy: methanol có khả năng tách pha kém, ethanol và isopropanol có khả năng tách pha tốt và ổn định với một số muối. Đồng thời ethanol thông dụng và rẻ hơn isopropanol, nên ethanol được lựa chọn là alcol tạo ATPS. Với alcol là ethanol, các muối NaCl , KH_2PO_4 không tách pha và dễ tủa muối nên không được lựa chọn. Muối Na_2SO_4 có sự tách pha nhanh nhưng hệ không ổn định, dễ xuất hiện tủa muối ở pha dưới do độ tan hạn chế của muối. Các muối còn lại (NaH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, K_2HPO_4 , K_2CO_3 , Na_2CO_3) tạo ATPS bền vững với ethanol. Với các muối có pH trung tính và kiềm như $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, K_2HPO_4 , K_2CO_3 , Na_2CO_3 , hệ bị sẫm màu khi thêm cao thô lá chè xanh. Nguyên nhân do các catechin không ổn

định ở môi trường có pH không phù hợp do các muối này tạo ra. Đặc biệt với các muối có tính kiềm mạnh (K_2CO_3 , Na_2CO_3), sự thay đổi màu sắc của hệ càng rõ rệt. Ngược lại, với hệ chứa hai muối có tính acid yếu là NaH_2PO_4 và $(NH_4)_2SO_4$ không quan sát thấy sự thay đổi màu này (**Hình 1**). Kết quả kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng cũng cho thấy EGCG phân bố tốt lên pha trên đối với hệ ethanol/ NaH_2PO_4 và ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$. Kết quả so sánh muối ở **Hình 3A** cho thấy khả năng tách pha và sự phân bố chất tan trong hệ phụ thuộc vào bản chất của muối, mặc dù tỷ lệ cao thu hồi ở hệ ethanol/ NaH_2PO_4 lớn hơn hệ ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$ nhưng hàm lượng EGCG trong cao tinh chế ở hệ ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$ lớn hơn hệ ethanol/ NaH_2PO_4 . Đồng thời, tỷ lệ V_f/V_b ở hệ ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$ nhỏ hơn ở hệ ethanol/ NaH_2PO_4 , điều này thuận lợi cho quá trình xử lý pha trên để thu sản phẩm do thể tích dịch tinh chế ít và nồng độ chất tan cao.

Với hệ ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$, các yếu tố ảnh hưởng quan trọng tiếp theo như tỷ lệ muối, tỷ lệ alcol, nồng độ dịch chiết, pH, thời gian chiết phân bố, loại cao thô được tiếp tục khảo sát. Kết quả đã tìm được các thông số thích hợp gồm tỷ lệ muối 25%, tỷ lệ alcol 17%, nồng độ dịch chiết 8%, pH 3-4, thời gian chiết phân bố 10 phút. Quá trình tinh chế bằng ATPS khi tiến hành ở quy mô lớn hơn cho kết quả khả quan, cao chiết thu được có màu sắc sáng hơn. Trên sắc ký đồ các mẫu cao thô và cao tinh chế ở **Hình 5** có thể thấy, nhiều tạp chất đã được loại bỏ. Hàm lượng EGCG trong cao tinh chế đạt 29,2%, tăng gần 3 lần so với trong cao thô. Trong nước, Phùng Minh Dũng (2005) nghiên cứu chiết xuất catechin chè xanh bằng phương pháp ngâm kiệt với dung môi methanol, tinh chế bằng phương pháp chiết phân bố lỏng lỏng lần lượt với *n*-hexan (6-7 lần) và ethyl acetat (5-6 lần) thu được cao chè có hàm lượng EGCG là 25,4%, hiệu suất thu sản phẩm là 8,5 g cao khô/100 gam nguyên liệu. Hoàng Văn Hoan (2014) nghiên cứu chiết catechin bằng

phương pháp ngâm nóng với dung môi nước, tinh chế bằng phương pháp chiết phân bố lỏng lỏng lần lượt với cloroform (3 lần) và ethyl acetat (3 lần) thu được cao chè có hàm lượng EGCG ~ 50%, hiệu suất thu sản phẩm gần 12 g cao khô/100 gam nguyên liệu. Tuy nhiên mục tiêu chính của nghiên cứu này là đi phân lập EGCG tinh khiết chứ không phải điều chế cao lá chè xanh giàu catechin [9]. Trên thế giới, Li Lin và cs. (2019) sử dụng hệ 2 pha ethyl acetat/nước làm dung môi để chiết xuất và tinh chế flavonoid từ lá chè, pha ethyl acetat tiếp tục được tinh chế bằng hệ 3 pha ethyl acetat/nước/chất hấp phụ (montmorillonit/than hoạt). Mục tiêu của nghiên cứu này là loại cafein và làm giàu catechin trong cao lá chè xanh, sản phẩm thu được có hàm lượng EGCG và cafein lần lượt là 58,6% và < 1,0% [10]. Điểm giống nhau giữa các quy trình trên là sử dụng kỹ thuật chiết phân bố cổ điển với các dung môi hữu cơ độc hại để tinh chế catechin, dù vậy hàm lượng hoạt chất và/hoặc hiệu suất thu sản phẩm không thật sự cao. Có thể thấy, quy trình tinh chế cao lá chè xanh bằng ATPS trong nghiên cứu này cho sản phẩm có hàm lượng EGCG tương đối cao, đồng thời quy trình tiến hành đơn giản và an toàn với môi trường. Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng hệ hai pha thân nước trong lĩnh vực chiết xuất dược liệu, đáp ứng xu hướng công nghệ chiết xuất “xanh” đang ngày càng được quan tâm.

5. Kết luận

Qua quá trình sàng lọc, hệ hai pha thân nước ethanol/ $(NH_4)_2SO_4$ được lựa chọn để nghiên cứu quá trình tinh chế cao lá chè xanh. Các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ cao thu hồi và hàm lượng EGCG trong cao tinh chế được khảo sát. Các điều kiện thích hợp gồm 17% ethanol, 25% $(NH_4)_2SO_4$, pH 3-4, thời gian chiết phân bố 10 phút, nồng độ dịch chiết 8%. Sản phẩm có hàm lượng EGCG $29,2 \pm 0,9\%$. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở để ứng dụng hệ hai pha thân nước trong chiết xuất và tinh chế cao dược liệu.

Tài liệu tham khảo

1. Liu Z. Q., Ma L. P., Zhou B., Yang L., Liu Z. L. (2000), Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein, *Chemistry and Physics of Lipids*, 106(1), 53-63.
2. Trần Trọng Biên, Trần Thị Tuyết, Đào Anh Hoàng, Nguyễn Thị Sen (2021), Tổng quan về công nghệ tinh chế, làm giàu hoạt chất trong sản xuất cao dược liệu, *Tạp chí Dược liệu*, 26(6/2021), 265-277.
3. Zhang W., Zhu D., Fan H., Liu X., Wan Q., Wu X., Liu P., Tang J. Z. (2015), Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system, *Separation and Purification Technology*, 141, 113-123.
4. Hou B. J., Wei Y. Q., Ma F., Wang X. N., Yang S. Z. (2017), Chelatometric salting-out extraction and characteristics of flavonoids from *Folium nelumbinis* based on an ethanol/ K_2HPO_4 system, *Separation Science and Technology*, 53(5), 717-724.
5. Zhang D. Y., Zu Y. G., Fu Y. J., Wang W., Zhang L., Luo M., Mu F. S., Yao X. H., Duan M. H. (2013), Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the

antioxidant activity, *Separation and Purification Technology*, 102, 26-33. 6. Trường Đại học Dược Hà Nội, Bộ môn Công nghiệp Dược (2018), Kỹ thuật chiết xuất dược liệu, Nhà xuất bản Y học, 51-54. 7. Wang H., Helliwell K., You X. (2000), Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC, *Food Chemistry*, 68(1), 115-121. 8. Phùng Minh Dũng (2005), *Nghiên cứu chiết xuất catechin từ Chè xanh Việt Nam*, Luận văn Thạc sỹ, trường Đại học Dược Hà Nội. 9. Hoàng Văn Hoan (2014), *Xây dựng và thử nghiệm quy trình công nghệ sản xuất nguyên liệu dược phẩm epigallocatechin gallat (EGCG) từ chè xanh*, Bộ công thương, mã số CNHD.ĐT.028/11-12. 10. Lin L., Zhang Y. Y., Chen R., Yang L., Ni H., Li. H. H. (2019), Highly simplified preparation of tea flavonoids from surplus tea leaves by the novel three-phase extraction and purification, *Separation Science and Technology*, 54(5), 741-746.

Tạp chí Dược liệu, tập 27, số 3/2022 (Trang 157 - 166)

ỨNG DỤNG CHIẾT XUẤT PHA RẮN (SPE) VÀO PHÂN TÍCH SAPONIN TRONG CÁC CHẾ PHẨM SÂM VIỆT NAM

Nguyễn Trường Huy¹, Vũ Huỳnh Kim Long¹, Ngô Thị Mỹ Duyên¹,

Trần Mộng Kha¹, Nguyễn Minh Đức^{1,2,*}

¹Khoa Dược, Đại học Tôn Đức Thắng;

²Trung tâm Khoa học và Công nghệ Dược Sài Gòn

*Email: nguyenminhduc@tdtu.edu.vn

(Nhận bài ngày 31 tháng 3 năm 2022)

Tóm tắt

Sâm Việt Nam, còn gọi sâm Ngọc Linh, tên khoa học *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. - Araliaceae, là một loài sâm quý đặc hữu của Việt Nam với thành phần hóa học saponin đặc trưng và tác dụng dược lý đã được chứng minh. Gần đây, để đáp ứng nhu cầu thị trường, sâm Việt Nam được chế biến dưới nhiều dạng chế phẩm khác nhau để làm thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Để định tính và định lượng saponin trong sâm Việt Nam, Dược điển Việt Nam V (2017) quy định dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-UV. Tuy nhiên, đối với các sản phẩm phối hợp sâm Việt Nam với các thành phần dược liệu hay tá dược khác, việc phân tích trở nên khó khăn hơn do ngoài saponin các chế phẩm còn chứa một hỗn hợp các chất gồm nhiều thành phần phức tạp với độ hòa tan khác nhau. Phương pháp chiết xuất pha rắn (Solid-Phase Extraction - SPE) đã được giới thiệu như là một giải pháp hiệu quả trong xử lý mẫu giúp làm giàu hợp chất đích và loại tạp để mang lại kết quả phân tích tốt hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng SPE C18 xử lý mẫu thử các chế phẩm để định tính các saponin đặc trưng của sâm Việt Nam gồm ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rd, ginsenosid-Rg₁ và majonosid-R2 bằng phương pháp SKLM và định lượng chúng bằng phương pháp HPLC-UV. Quy trình định lượng saponin trong sâm Việt Nam áp dụng xử lý mẫu bằng SPE đã được thẩm định đạt yêu cầu theo các hướng dẫn của ICH. Tổng hàm lượng 4 saponin ginsenosid-Rb₁ (G-Rb₁), ginsenosid-Rd (G-Rd), ginsenosid-Rg₁ (G-Rg₁) và majonosid-R2 (M-R2) trong chế phẩm bột cao sâm Việt Nam 20% và trà hòa tan sâm Việt Nam lần lượt là 1,86% và 2,01% tính theo khối lượng chế phẩm khan. Kết quả đã chứng minh việc áp dụng SPE vào xử lý mẫu thử không chỉ giúp giải quyết các trở ngại trong quá trình sắc ký do thành phần tá dược trong các chế phẩm gây ra mà còn mang lại tính hiệu quả và ổn định cho quy trình phân tích.

Từ khóa: Kỹ thuật chiết xuất pha rắn (SPE), Sâm Việt Nam, *Panax vietnamensis*, Saponin, HPLC.

Summary

Application of Solid Phase Extraction for Analysis of Saponins in Vietnamese Ginseng Products

Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae) is a precious endemic *Panax* species of Vietnam. As a result, it is processed to form various preparations as pharmaceuticals or health foods in order to meet the market demand. According to Vietnamese Pharmacopoeia V (2017), TLC and HPLC-UV, respectively, are used for qualitative and quantitative analysis of saponins in Vietnamese ginseng crude drug. However, most of product formular containing Vietnamese ginseng is commonly combined with other excipients or herbals. These combination leads to peak distortion and overlaps as well as negatively influences to HPLC systems. Due to long-term repeated analyses, the accumulation of contamination onto HPLC columns causing clogging, delay of the retention time, unstable HPLC process, etc. Solid-phase extraction (SPE) is an effective sample preparation method which is applied in this study to purify samples of Vietnamese ginseng products for TLC and HPLC analysis of characteristic saponins, including ginsenoside-Rb₁ (G-Rb₁), ginsenoside-Rd (G-Rd), ginsenoside-Rg₁ (G-Rg₁), and majonoside-R2 (M-R2). The result showed that SPE C18 helps exclude the influence of excipients in the product formulation, enrich and purify the target compounds, which makes the HPLC process stable and reliable.

Keywords: Solid Phase Extraction, Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, Saponin, HPLC.