

phát triển được chất mới, do đó kết quả nghiên cứu thu được trong nghiên cứu này bên cạnh góp phần giải thích lợi ích, công dụng chữa đái tháo đường của dược liệu SVN và các bài thuốc chứa SVN theo y học cổ truyền và y học dân gian còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các bước tiếp theo của SVN và hoạt chất ginsenosid Rd như nghiên cứu cơ chế sinh học phân tử,

nghiên cứu tác dụng dược lý *in vivo*, nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn hóa dược liệu SVN... để góp phần phát triển sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ SVN theo tiêu chuẩn y dược học hiện đại.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2019.01.

Tài liệu tham khảo

1. Dung H. T., Grushvisky I. V. (1985), A new species of the genus *Panax* L., Araliaceae in Vietnam: *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., *Bot. J. Vietnam*, 70, 518-522. Yang W. Z., Hu Y., Wu W. Y., Ye M., Guo D. A. (2014), Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): A systematic review of their chemical diversity, *Phytochemistry*, 106, 7-14. 2. Tung N. H., Thuong P. T. (2019), Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.): phylogenetic, phytochemical, and pharmacological profiles, *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), 59-62. 3. Hội đồng Dược điển Việt Nam (Bộ Y tế), Dược Điển Việt Nam V (2018), 1313-1315. 4. Vu V. T., Nguyen N. H., Anh N. T. H., Tung P. H. T., Thuong P. T., Tung N. H. (2023), Panaxindole, a novel indole alkaloid N-glucoside from the leaves of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Vietnamese ginseng), *Journal of Natural Medicines*, 77(4), 972-977. 5. Anh N. T. H., Ngan D. T., Dung D. M., Binh N. T. T., Hieu N. N., Tuan V. V., Tung N. H. (2024), Investigation on non-hydrophilic components from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.), *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 133, in press. 6. Li T., Zhang X. D., Song Y. W., Liu J. W. (2005), A microplate-based screening method for α -glucosidase inhibitors, *Natural Product Research and Development*, 10, 1128-1134. 7. Trott O., Olson A. J. (2010), AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. 8. Ha N. T. T., Quan P. M., Tuyen N. V., Tra N. T., Anh L. T. T., Son N. T. (2022), Chemical constituents of *Alocasia odora* rhizomes and their biological activities: experimental and molecular docking approaches, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32, 819-826. 9. Nguyen M. D., Kasai R., Ohtani K., Ito A., Nguyen T. N., Yamasaki K., Tanaka O. (1994), Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* HA et Grushv. collected in central Vietnam. II, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(1), 115-122. 10. Agrawal P.K. (1992), NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330. 11. Afrapoli F. M., Asghari B., Saeidnia S., Ajani Y., Mirjani M., Malmir M., Bazaz R. D., Hadjiakhoondi A., Salehi P., Hamburger M., Yassa N. (2012), *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 1-6. 12. Tang H., Huang L., Sun C., Zhao D. (2020), Exploring the structure-activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies, *Food & Function*, 11, 3332-3350. 13. Ngoc L.M., Kim N. B., Son N. N., Khanh D. T. H., Tung B. T. (2022), *In vitro* and *in silico* screening of bioactive compounds from *Jasminum subtriplinerne* Blume as α -glucosidase inhibitor, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 38(1), 34-44. 14. Hossani U., Das A. K., Ghosh S., Sil P. C. (2020), An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications, *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111738. 15. Dhorajiwala T. M., Halder S. T., Samant L. (2019), Comparative *in silico* molecular docking analysis of L-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals, *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6, 101-108. 16. Kim D. H. (2018), Gut microbiota-mediated pharmacokinetics of ginseng saponins, *Journal of Ginseng Research*, 42(3), 255-263. 17. Jeong J. J., Le T. H. V., Lee S. Y., Eun S. H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D. H. (2015), Anti-inflammatory effects of vana-ginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *International Immunopharmacology*, 28(1), 700-706. 18. Teng H., Chen L., Fang T., Yuan B., Lin Q. (2017), Rb2 inhibits α -glucosidase and regulates glucose metabolism by activating AMPK pathways in HepG2 cells, *Journal of Functional Foods*, 28, 306-313. 19. Wang H. P., Fan C. L., Lin Z. Z., Yin Q., Zhao C., Peng P., Zhang R., Wang Z. L., Du J., Wang Z. B. (2023), Screening of potential α -glucosidase inhibitors from the roots and rhizomes of *Panax* ginseng by affinity ultrafiltration screening coupled with UPLC-ESI-orbitrap-MS method, *Molecules*, 28(5), 2069. 20. Wang. W, Guan F., Sagratini G., Yan J., Xie J., Jin Z., Liu M., Liu H., Liu J. (2023), Ginsenoside Rd attenuated hyperglycemia via Akt pathway and modulated gut microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats, *Current Research in Food Science*, 6, 100491. 21. Song X., Wang L., Fan D. (2022), Insights into recent studies on biotransformation and pharmacological activities of ginsenoside Rd. *Biomolecules*, 12(4), 512.

Tạp chí Dược liệu, tập 30, số 1/2025 (Trang 24 - 30)

**TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT ĐỂ BẢO CHẾ CAO ĐẶC
TAN THÔNG PHONG DỰA TRÊN CHẤT ĐÁNH DẤU BERBERIN CLORID**

Bùi Hồng Cường^{1,*}, Bùi Thị Ngọc Huyền²

¹Khoa Dược liệu - Dược học cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội;

²Công ty Cổ phần Dược phẩm VCP

*Email: cuongbh@hup.edu.vn

(Nhận bài ngày 15 tháng 6 năm 2024)

Tóm tắt

Phương thuốc Tan thông phong gồm hoàng bá, thương truật, ngưu tất, hy thiêm, trị mấu, mộc qua được sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị viêm khớp, gout. Cao đặc Tan thông phong được bảo chế bằng phương pháp chiết hồi lưu với hỗn hợp ethanol-nước ở quy mô phòng thí nghiệm. Berberin clorid (BBR) là thành phần hoạt chất chính của hoàng bá. Trong nghiên cứu này, quy trình chiết xuất để bảo chế cao đặc Tan thông phong được tối ưu hóa để tối đa hóa cả hàm lượng và hiệu suất chiết BBR bằng cách sử dụng thiết kế thí nghiệm D-optimal và mạng neuron nhân tạo. Các thông số tối ưu của quy trình

đã được thiết lập với nồng độ ethanol là 90 %, tỷ lệ dung môi/được liệu là 8 mL/g, thời gian chiết là 90 phút, số lần chiết là 3. Hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 1,29 % và 73,16 %.

Từ khóa: Mạng neuron nhân tạo, phương thuốc Tan thông phong, Quy trình chiết xuất, Tối ưu hóa.

Summary

Optimization of the Extraction Process for Preparing the Tan thông phong Viscous Extract Based on Marker Berberine Chloride

The Tan thông phong remedy consisting of *Cortex Phellodendri chinensis*, *Rhizoma Atractylodis*, *Radix Achyranthis bidentatae*, *Herba Siegesbeckiae*, *Rhizoma Anemarrhenae*, *Fructus Chaenomelis* is used in traditional medicine to treat arthritis and gout. The Tan thông phong viscous extract was prepared by reflux extraction with the ethanol-water mixture in the laboratory scale. Berberine chloride (BBR) is the main active compound of *Cortex Phellodendri*. In this study, the extraction process for preparing the Tan thông phong viscous extract was optimized to maximize both the content and extraction yield of BBR using an D-optimal experimental design and artificial neural network methodology. The optimal parameters of the process were established with the ethanol content of 90 %, the solvent-material ratio of 8 ml per gram and the extraction time of 90 min for each of the 3 times. The content and extraction yield of BBR were 1.29 % and 73.16 %, respectively.

Keywords: Artificial neural network, Tan thông phong remedy, Extraction process, Optimization.

1. Đặt vấn đề

Phương thuốc Tan thông phong gồm hoàng bá, thương truật, ngưu tất, hy thiêm, tri mẫu, mộc qua được gia giảm từ phương thuốc Tam diệu thang, có tác dụng thanh nhiệt sát thấp, trị chứng phong thấp nhiệt tý có biểu hiện sưng, nóng, đỏ, đau ở bàn chân và đầu gối, chi dưới nặng nề [1],[2]. Dạng thuốc thang truyền thống gây nhiều bất tiện cho người sử dụng và không kiểm soát được hiệu suất chiết hoạt chất, từ đó không kiểm soát được liều dùng. Cao đặc là dạng bán thành phẩm trung gian để sản xuất các dạng bào chế hiện đại như thuốc cốm, viên nang, viên nén... Việc nghiên cứu tiêu chuẩn hoá và xác định được hàm lượng hoạt chất trong cao đặc phương thuốc là cần thiết. Berberin clorid (BBR) là thành phần hoạt chất chính trong được liệu hoàng bá (vị quân), có tác dụng giảm acid uric máu [3],[4], bảo vệ thận [4], chống viêm do các tinh thể muối urat lắng đọng ở các khớp [5], kháng khuẩn, chống viêm [6]... Do vậy việc nghiên cứu chiết xuất nhằm thu được cao đặc có hàm lượng và hiệu suất chiết BBR cao là cần thiết. Phương pháp thiết kế thí nghiệm (experimental design) và lựa chọn điều kiện tối ưu dựa trên nguyên tắc của mạng neuron nhân tạo (artificial neural network - ANN) với sự hỗ trợ của các phần mềm máy tính [7] là một công cụ hiệu quả trong việc tối ưu hóa các quy trình chiết xuất. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chiết xuất để bào chế cao đặc của phương thuốc Tan thông phong được công bố. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu ứng dụng thiết kế thí nghiệm và phương pháp mạng neuron nhân tạo nhằm khảo sát và tối ưu hoá một số điều kiện chiết xuất để bào chế cao đặc phương thuốc căn cứ trên hàm lượng và hiệu suất chiết BBR.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Các được liệu: Hoàng bá (*Cortex Phellodendri chinensis*), thương truật (*Rhizoma Atractylodis*), ngưu tất (*Radix Achyranthis bidentatae*), hy thiêm (*Herba Siegesbeckiae*), tri mẫu (*Rhizoma Anemarrhenae*), mộc qua (*Fructus Chaenomelis*) đạt Dược điển Trung Quốc (ĐDTQ) 2020 [2] được cung cấp bởi công ty TNHH Đông dược Dân Lợi

(phường Cam Phúc Bắc, thành phố Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa).

2.2. Hoá chất, chất chuẩn

Chất chuẩn berberin clorid ($C_{20}H_{17}NO_4.HCl$) (BBR) hàm lượng 87,89 % (nguyên trạng) (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Lot No. WS.0317168.03). Methanol, acetonitril, acid ortho-phosphoric (Merck), nước tinh khiết dùng cho HPLC.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Shimadzu (Nhật Bản) gồm: Bơm LC-30AD, detector mảng diod (DAD) SPD-M20A, hệ thống tiêm mẫu tự động SIL-20A, bộ phận ổn nhiệt CTO-10AS, cột sắc ký Shim-pack GIST C₁₈; bể siêu âm WUC-D22H (Hàn Quốc); cân phân tích AND GR200 (Nhật Bản) độ chính xác 0,1 mg; cân phân tích Mettler Toledo XPE105 (Thụy Sĩ) độ chính xác 0,01 mg; hệ thống lọc áp suất giảm, màng lọc 0,45 µm x 47 mm Supelco (Mỹ), màng lọc syringe 0,45 µm Shimadzu (Nhật Bản), lọ đựng mẫu 1,5 mL Shimadzu (Nhật Bản); tủ sấy Memmert (Đức); máy cô quay chân không IKA® RV 8 (Đức); máy ly tâm, bếp bảo ôn, bể đun cách thủy; các dụng cụ chế biến thuốc; các dụng cụ thủy tinh: Bình cầu, bình nón, bình định mức và các dụng cụ khác tại phòng thí nghiệm đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích (Khoa Dược liệu - Dược học cổ truyền và Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Điều chế cao đặc

Chế biến các vị thuốc: Loại tạp, rửa sạch, thái phiến, sấy khô. Các vị thuốc được xay thô, rây qua rây 2 mm.

Chiết xuất và bào chế cao đặc: Cân 27 g bột thô các vị thuốc gồm: Hoàng bá 3 g, thương truật 4,8 g, ngưu tất 4,8 g, hy thiêm 4,8 g, tri mẫu 4,8 g, mộc qua 4,8 g cho vào bình cầu 500 mL có lắp sinh hàn hồi lưu, thêm dung môi, ngâm 60 phút. Đun sôi nhẹ bằng bếp bảo ôn, lọc dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm bằng máy cô quay chân không ở nhiệt độ sôi của dịch chiết đến thể chất lỏng sánh, chuyển sang cô cách thủy ở 80°C đến thể chất cao đặc (độ ẩm < 20%). Khảo sát chọn các

biến độc lập và biến phụ thuộc, từ đó khảo sát sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên các biến phụ thuộc theo phương pháp thiết kế thí nghiệm [7] như sau: Biến độc lập: Tỷ lệ dung môi/dược liệu (DM/DL) (X_1 , ml/g); Nồng độ ethanol (X_2 , %); Thời gian chiết 1 lần (X_3 , phút); Số lần chiết (X_4). Biến phụ thuộc: Hàm lượng BBR (Y_1 , %) và hiệu suất chiết BBR (Y_2 , %). Trong đó, Y_2 được tính bằng tỷ lệ giữa khối lượng BBR chiết được và khối lượng BBR trong nguyên liệu hoàng bá theo công thức:

$$Y_2(\%) = \frac{C_{cd} \times m_{cd} \times (100 - H_{cd})}{C_{dl} \times m_{dl} \times (100 - H_{dl})} \times 100$$

Trong đó: C_{cd} , C_{dl} : Hàm lượng của BBR trong cao đặc hoặc dược liệu hoàng bá (%); m_{cd} , m_{dl} : Khối lượng của cao đặc thu được hoặc dược liệu hoàng bá đem chiết (g); H_{cd} , H_{dl} : Hàm ẩm của cao đặc hoặc dược liệu hoàng bá (%).

Tối ưu hóa quy trình: Thiết kế thí nghiệm và lựa chọn điều kiện tối ưu dựa trên nguyên tắc của mạng neuron nhân tạo với sự trợ giúp của phần mềm SAS JMP Pro 15 [7] nhằm thu được hàm lượng và hiệu suất chiết BBR trong cao đặc lớn nhất. Sau khi xác định được điều kiện chiết xuất tối ưu, tiến hành thực nghiệm lặp lại 3 lần tại điều kiện này và so sánh với kết quả dự đoán bởi phần mềm để kiểm định lại mô hình.

Xác định độ ẩm: Các dược liệu: Theo các chuyên luận tương ứng trong ĐDTQ 2020 [2]. Cao đặc: Cân chính xác khoảng 1,0000 g cao, sấy ở 105°C trong 5 h. Cân lại. Tính độ ẩm của cao theo công thức:

$$H(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

Trong đó: m_0 , m_1 : Khối lượng cao trước và sau sấy.

Định lượng BBR trong cao đặc (Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao)

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác 6,27 mg chất chuẩn BBR (hàm lượng 87,89%) cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 8 mL methanol, siêu âm cho tan hết và thêm vừa đủ đến vạch bằng methanol thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 551,07 µg/mL. Pha dãy chuẩn BBR có nồng độ trong khoảng: 33,44 - 551,07 µg/mL. Xây dựng đường chuẩn. **Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 0,2000 g cao vào bình nón 50 mL có nút mài, thêm chính xác 25 mL methanol, cân, siêu âm 30 phút. Để nguội. Cân lại, bổ sung khối lượng mất đi bằng methanol. Lắc đều. Lọc qua màng lọc syringe 0,45 µm thu được dung dịch tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 µm); Pha động: Acetonitril (dung môi A) và acid phosphoric 0,05% (dung môi B) theo chương trình rửa giải gradient: 0 - 5 phút: 10 - 40% A; 5 - 10 phút: 40 - 80% A; 10 - 15 phút: 80 - 40% A; 15 - 25 phút: 40 - 10% A; Tốc độ dòng: 1 mL/phút; Nhiệt độ cột: 20°C; Thể tích tiêm mẫu: 5 µL; Bước sóng

phát hiện: 347 nm. Tiêm riêng biệt 5 µl các dung dịch chuẩn vào máy sắc ký, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic BBR. Xây dựng đường hồi qui tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch chuẩn (µg/mL) theo phương trình $y = ax + b$. Tiêm 5 µL dung dịch thử, ghi nhận sắc ký đồ, diện tích của pic BBR. Nồng độ BBR trong dung dịch thử (µg/mL) được tính theo công thức:

$$C_t = \frac{S_t - b}{a}$$

Hàm lượng BBR trong cao khô tuyệt đối được tính theo công thức:

$$X(\%) = C_t \times \frac{1,25}{m_{cd} \times (100 - H)}$$

Trong đó: S_t : Diện tích pic BBR trên sắc ký đồ của dung dịch thử; C_t : Nồng độ của BBR trong dung dịch thử (µg/mL); a: Giá trị hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính; b: Giá trị hệ số chặn của đường hồi quy tuyến tính; m_{cd} : Khối lượng cao đặc (g); H: Hàm ẩm của cao đặc (%).

Phương pháp định lượng đã được thẩm định có độ nhạy cao, có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính từ 11,29 đến 361,23 µg/ml ($r = 0,9999$), độ lặp lại và độ chính xác trung gian tốt (RSD < 3,7%), độ đúng cao (tỷ lệ thu hồi 97,77% đến 100,36%) [8], đạt yêu cầu [9],[10], giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,052 µg/mL và 0,172 µg/mL.

Định lượng BBR trong dược liệu hoàng bá: Theo ĐDTQ 2020 [2].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thiết kế thí nghiệm

Dược liệu hoàng bá được chế biến, xác định độ ẩm và định lượng BBR. Kết quả hàm lượng BBR trong hoàng bá là 4,96%. Đây là nguyên liệu dùng để nghiên cứu quy trình chiết xuất nhằm tối ưu hoá hàm lượng và hiệu suất chiết BBR trong cao đặc. Có nhiều thông số ảnh hưởng đến hàm lượng và hiệu suất chiết BBR trong cao đặc. Khảo sát cho thấy với phương pháp chiết hồi lưu bằng ethanol 70%, nếu kích thước nguyên liệu ≤ 2 mm cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 1,27% và 81,35%, trong khi nguyên liệu dạng phiến cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 0,93% và 61,95%. Dung môi ethanol 90% cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 1,37% và 81,87%, trong khi dung môi nước cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 0,25% và 13,60%. Nếu chiết ngâm ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày với dung môi ethanol 70% cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 0,88% và 37,01%. Như vậy, kích thước nguyên liệu ≤ 2 mm, chiết hồi lưu, dung môi là hỗn hợp ethanol - nước cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR cao hơn so với nguyên liệu dạng phiến, chiết ở nhiệt độ phòng hoặc với dung môi nước. Vì vậy kích thước

nguyên liệu ≤ 2 mm, chiết ở nhiệt độ sôi với hỗn hợp ethanol - nước đã được chọn và 4 biến độc lập được chọn trong nghiên cứu này là: tỷ lệ DM/DL, nồng độ ethanol, thời gian chiết và số lần chiết. Qua khảo sát, tỷ lệ DM/DL là 4 mL/g là mức dung môi thấp nhất đủ ngập hoàn toàn được liệu trong quá trình chiết với thiết bị và quy mô phòng thí nghiệm. Với tỷ lệ DM/DL > 12 mL/g thì lượng dịch chiết nhiều, thời gian chiết và chi phí cao dài gây tăng chi phí và khó khăn khi áp dụng vào sản xuất. Khảo sát chiết bằng nước và ethanol nồng độ 30, 50, 70, 90 và 96% cho thấy: Hàm lượng BBR thu được lần lượt là 0,25; 0,39; 0,79; 1,13; 1,37; 1,37% và hiệu suất chiết BBR lần lượt là 13,60; 22,10; 48,61; 68,61; 81,87; 72,19%. Như vậy với dung môi nước và ethanol 30% và 50% cho hàm lượng và hiệu suất chiết BBR thấp. Nồng độ ethanol 90% cho hiệu suất

chiết cao nhất, với nồng độ ethanol 96% thì hiệu suất chiết BBR lại có xu hướng giảm. Thời gian cho mỗi lần chiết thông thường từ 60 đến 180 phút, số lần chiết thông thường 1 - 3 lần. Từ đó, khoảng biến thiên của các biến độc lập được xác định: nồng độ ethanol (X_2): 60 - 96%, tỷ lệ DM/DL (X_1): 4 - 12 mL/g, thời gian chiết (X_3): 60 - 180 phút, số lần chiết (X_4): 1 - 3 và yêu cầu của các biến phụ thuộc: Hàm lượng BBR (Y_1) $\rightarrow$ max ($> 1,2\%$), hiệu suất chiết BBR (Y_2) $\rightarrow$ max ($> 70\%$).

Thiết kế thí nghiệm bằng phần mềm SAS JMP Pro 15 theo mô hình D-optimal gồm 24 thí nghiệm (Bảng 1). Tiến hành điều chế cao đặc, cân cao, xác định độ ẩm của cao, định lượng BBR trong cao và tính hiệu suất chiết BBR. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thiết kế thí nghiệm và kết quả biến phụ thuộc

Thí nghiệm	Biến độc lập				Biến phụ thuộc	
	X_1 (%)	X_2 (mL/g)	X_3 (phút)	X_4 (lần)	Y_1 (%)	Y_2 (%)
1	60	4	120	2	0,91	44,09
2	78	4	180	3	1,19	64,20
3	78	8	120	1	1,34	56,15
4	78	8	120	2	1,19	70,84
5	60	12	60	1	1,11	59,03
6	96	4	180	1	1,35	44,85
7	96	12	60	1	2,21	79,15
8	60	4	60	1	0,88	27,98
9	60	12	60	3	1,14	76,05
10	60	12	180	3	1,09	75,25
11	96	4	120	3	1,38	67,69
12	60	12	180	1	1,04	49,03
13	96	12	180	3	1,92	97,84
14	96	8	180	2	1,22	63,15
15	96	12	180	1	1,75	79,82
16	82,68	12	60	3	1,35	85,13
17	79,98	4	60	2	1,24	52,95
18	96	8	60	3	1,56	84,82
19	60	4	60	3	0,94	53,15
20	78	8	120	1	1,21	48,26
21	96	4	60	1	1,97	47,00
22	60	4	180	1	0,77	33,32
23	60	7,24	180	3	0,98	64,75
24	96	12	120	3	1,45	85,02

3.2. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất

Xây dựng và đánh giá mô hình: Sử dụng mạng neuron nhân tạo để thiết lập mối quan hệ giữa các biến phụ thuộc và biến độc lập với thông số như sau: Số neuron lớp vào: 4 (bằng số biến độc lập); Số neuron lớp ra: 2 (bằng số biến phụ thuộc); Số neuron lớp ẩn: 6; Hàm kích hoạt: tan hyperbol

(tanH); Tốc độ luyện: 0,1; Số chu kỳ luyện: 1000.

Mô hình mạng neuron nhân tạo được thẩm định bằng phương pháp thẩm định chéo (cross validation): Dữ liệu trong Bảng 1 được chia thành 5 nhóm, lần lượt lấy ra 1 nhóm để kiểm chứng mô hình, 4 nhóm còn lại dùng để xây dựng mô hình. Kết quả đánh giá mạng neuron nhân tạo được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá mạng neuron nhân tạo

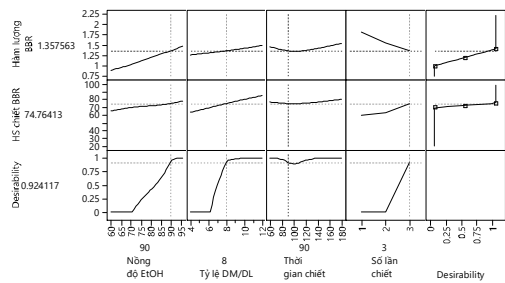
Biến đầu ra Thông số	Hàm lượng BBR		Hiệu suất chiết BBR	
	Dữ liệu luyện	Dữ liệu thẩm định	Dữ liệu luyện	Dữ liệu thẩm định
R^2	0,9418	0,9330	0,8974	0,9082
-LogLikelihood	-18,5761	-8,0855	48,5676	24,8741
RMSE*	0,0758	0,0881	5,0356	5,4213
MAD**	0,0558	0,0779	3,8743	4,7687

* The root average square error: Căn bậc hai của sai số bình phương trung bình.

** The average of the absolute values of the differences: Giá trị sai khác tuyệt đối trung bình.

Có thể nhận thấy, với cả hai tập dữ liệu luyện và thử định, giá trị $R^2 > 0,8$ và các giá trị -LogLikelihood, RMSE, MAD đều khá nhỏ nên mô hình xây dựng được đáng tin cậy.

Hình 1 biểu diễn sự biến thiên của các biến phụ thuộc theo các biến độc lập và giá trị của hàm hy vọng



Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên của các biến phụ thuộc theo các biến độc lập và giá trị của hàm hy vọng

Có thể nhận thấy rằng, khi nồng độ ethanol tăng, cả hàm lượng và hiệu suất chiết BBR đều có xu hướng tăng lên, hàm lượng BBR tăng rõ và tuyến tính hơn hiệu suất chiết BBR. Như vậy, nồng độ ethanol càng cao thì làm tăng khả năng chiết hoạt chất BBR, đồng thời giảm khả năng chiết tạp chất.

Khi tỷ lệ DM/DL tăng, cả hàm lượng BBR và hiệu suất chiết BBR đều có xu hướng tăng lên

tuyến tính cho thấy lượng dung môi càng nhiều thì khả năng chiết BBR càng tăng lên.

Khi tăng dần thời gian chiết thì hàm lượng và hiệu suất chiết BBR có sự biến thiên nhưng không đáng kể. Cụ thể là ở trong khoảng thời gian chiết từ 80 phút đến 130 phút thì hàm lượng BBR có giảm nhẹ xuống có thể do với khoảng thời gian chiết này BBR được chiết ra không thay đổi nhiều nhưng lượng tạp chất chiết được tăng lên khi tăng thời gian chiết gây giảm hàm lượng BBR. Khi thời gian chiết tiếp tục tăng lên từ 130 phút đến 180 phút thì càng tăng thời gian chiết, lượng BBR chiết được càng tăng nên cả hàm lượng và hiệu suất chiết BBR tăng lên.

Khi tăng số lần chiết từ 1 lên 2 lên 3, hàm lượng BBR có xu hướng giảm còn hiệu suất chiết BBR có xu hướng tăng cho thấy chiết càng nhiều lần thì hoạt chất BBR được chiết ra càng nhiều, nhưng tạp chất được chiết càng nhiều hơn nên hiệu suất tăng nhưng hàm lượng BBR lại giảm.

Xác định các giá trị tối ưu của biến độc lập và kiểm chứng mô hình

Điều kiện chiết xuất tối ưu được xác định bằng phương pháp hàm hy vọng tuyến tính (Desirability function). Đây là hàm số biểu diễn mức độ thoả mãn của người làm thí nghiệm theo giá trị của biến phụ thuộc (giá trị bằng 1 tương ứng với thoả mãn hoàn toàn). Giá trị của hàm hy vọng riêng d_1 (tương ứng với biến Hàm lượng BBR (Y_1)) và d_2 (tương ứng với biến Hiệu suất chiết BBR (Y_2)) được biểu diễn ở Bảng 3.

Bảng 3. Giá trị của hàm hy vọng tuyến tính theo các biến phụ thuộc

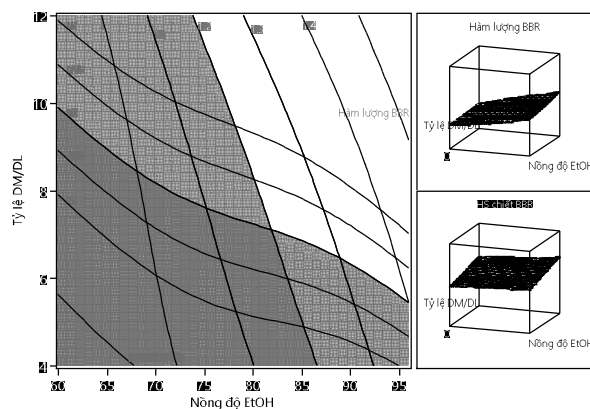
Hàm lượng BBR (Y_1)	Hiệu suất chiết BBR (Y_2)
$d_1 = \begin{cases} 1 & \text{nếu } Y_1 \geq 1,4 \\ 0 & \text{nếu } Y_1 < 1,2 \\ \frac{Y_1 - 1,2}{1,4 - 1,2} & \text{nếu } 1,2 \leq Y_1 < 1,4 \end{cases}$	$d_2 = \begin{cases} 1 & \text{nếu } Y_2 \geq 75 \\ 0 & \text{nếu } Y_2 < 70 \\ \frac{Y_2 - 70}{75 - 70} & \text{nếu } 70 \leq Y_2 < 75 \end{cases}$

Với giả thiết biến Hiệu suất chiết BBR có tầm quan trọng gấp đôi biến Hàm lượng BBR thì hàm hy vọng chung (d) được tính theo công thức:

$$d = d_1^{\frac{1}{3}} \times d_2^{\frac{2}{3}}$$

Không gian thiết kế (Design space) tương ứng với giá trị Hàm lượng BBR (Y_1) $\geq 1,2\%$ và Hiệu suất chiết BBR (Y_2) $\geq 70\%$ được biểu diễn ở Hình 2.

Kết quả tính toán điều kiện chiết xuất tối ưu (tương ứng với $d \rightarrow \max$) được trình bày ở Bảng 4 (đây là một điểm trong không gian thiết kế). Tiến hành thí nghiệm xác định hàm lượng BBR và hiệu suất chiết BBR theo điều kiện chiết xuất tối ưu này, lặp lại 3 lần. Kết quả so sánh giữa số liệu thực nghiệm với dự đoán của mô hình cũng được trình bày ở Bảng 4.



Hình 2. Không gian thiết kế theo Nồng độ ethanol và Tỷ lệ DM/DL (vùng màu trắng) (Thời gian chiết = 90; Số lần chiết = 3).

Bảng 4. Giá trị dự đoán và kết quả thực nghiệm kiểm chứng (n = 3)

Biến độc lập				Biến phụ thuộc					
X ₁ (%)	X ₂ (ml/g)	X ₃ (ph)	X ₄ (lần)	Y ₁ (%)		Y ₂ (%)			
				Dự đoán	Thực nghiệm	Độ chính xác (%)	Dự đoán	Thực nghiệm	Độ chính xác (%)
90	8	90	3	1,36	1,29 ± 0,07	94,73	74,76	73,16 ± 3,48	97,86

Như vậy, từ kết quả ở Bảng 4, điều kiện chiết xuất với nồng độ ethanol là 90 %, tỷ lệ dung môi/được liệu là 8 ml/g, thời gian chiết là 90 phút, số lần chiết là 3, thực nghiệm cho kết quả gần với dự đoán của phần mềm được chọn. Độ chính xác của hàm lượng BBR đạt 94,73 %, độ chính xác của hiệu suất chiết BBR đạt 97,86 %.

4. Bàn luận

Tối ưu hóa hàm lượng và hiệu suất chiết berberin clorid (BBR) trong thiết kế thí nghiệm nhằm đảm bảo an toàn và hiệu quả của phương thuốc: Phương thuốc Tan thông phong gồm 6 vị thuốc hoàng bá, thương truật, ngưu tất, hy thiêm, tri mẫu, mộc qua, trong đó hoàng bá có tác dụng thanh nhiệt táo thấp, giải độc tiêu viêm, tư âm giáng hỏa là vị Quân, quyết định tác dụng của phương thuốc. BBR là thành phần hoạt chất chính của hoàng bá, có tác dụng giảm acid uric máu [3],[4], bảo vệ thận [4], chống viêm do các tinh thể muối urat lắng đọng ở các khớp [5], kháng khuẩn, chống viêm [6]. BBR được dùng như một chất đánh dấu để kiểm nghiệm chất lượng được liệu hoàng bá và các chế phẩm có thành phần hoàng bá [2]. DĐTQ 2020 quy định hàm lượng berberin clorid (C₂₀H₁₇NO₄HCl) trong được liệu hoàng bá không được ít hơn 3,0 %, tính theo được liệu khô kiệt; hàm lượng berberin clorid trong chế phẩm Tam diệp hoàn không được ít hơn 2 mg/g [2]. Từ những lý do đó, trong nghiên cứu này, BBR được chọn làm chất đánh dấu cho phương thuốc. Hàm lượng BBR trong nguyên liệu hoàng bá nghiên cứu được xác định là 4,96 % đạt yêu cầu của DĐTQ 2020. Từ các thí nghiệm được tiến hành, kết quả hàm lượng BBR trong cao đặc Tan thông phong dao động từ 0,77% đến 2,21%, hiệu suất chiết BBR trong khoảng 27,98 - 97,84%. Nhận thấy, hoạt chất chiết được với tỷ lệ tương đối cao và phụ thuộc vào sự thay đổi của điều kiện chiết xuất như nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/được liệu, thời gian chiết và số lần chiết,.. Chúng tỏ hoạt chất BBR trong cao đặc Tan thông phong là khá ổn định, phản ánh tốt sự phụ thuộc của biến đầu vào và biến đầu ra trong quy trình. Kết quả đã xây dựng được quy trình chiết xuất để bào chế cao đặc phương thuốc có hàm lượng và hiệu suất chiết BBR cao. Trong phương thuốc còn có những thành phần hoạt chất khác như β -ecdysterone trong ngưu tất, atractyadin trong thương truật,.. cũng cần được tối ưu hóa quy trình chiết xuất trong các nghiên cứu tiếp theo.

Chọn phương pháp chiết hồi lưu với hỗn hợp ethanol - nước để thiết kế thí nghiệm: Khảo sát sơ bộ cho thấy, phương thuốc được ngâm ở nhiệt độ phòng và cô thành cao đặc cho kết quả hàm lượng BBR và hiệu suất chiết BBR khá thấp, phương pháp chiết hồi lưu với cùng điều kiện dung môi thì cho kết quả cao hơn. Tuy nhiên, phương thuốc được chiết hồi lưu với nước hoặc ethanol thấp độ cũng cho kết quả hàm lượng BBR và hiệu suất chiết BBR tương đối thấp. Khi thay đổi nồng độ ethanol sẽ ảnh hưởng đến khả năng hòa tan hoạt chất. Khi nồng độ ethanol tăng thì hàm lượng và hiệu suất chiết BBR cũng tăng lên. Nồng độ ethanol 90% cho hiệu suất chiết cao nhất, với nồng độ ethanol 96% thì hiệu suất chiết BBR lại có xu hướng giảm. Từ đó, trong nghiên cứu này, phương pháp chiết hồi lưu với ethanol 60 - 96% được lựa chọn để thiết kế thí nghiệm. Tham khảo các chuyên luận có mô tả giai đoạn chiết xuất cao từ một phương thuốc cho thấy thời gian chiết 1 lần thường từ 60 - 180 phút và số lần chiết thường 2 - 3 lần [2]. Từ đó, chúng tôi đã chọn khoảng biến thiên của thời gian chiết là 60 - 180 phút/lần và khoảng biến thiên của số lần chiết là 1 - 3.

Theo các nguyên tắc Chất lượng theo thiết kế (Quality by Design) hiện đại được chỉ ra trong Hướng dẫn phát triển được phẩm của Ủy ban hoà hợp quốc tế [11], việc thực hiện thiết kế thí nghiệm và tối ưu hoá, xác định không gian thiết kế là một bước quan trọng và thiết yếu trong nghiên cứu và phát triển nhằm cải tiến và kiểm soát chất lượng được phẩm. Có hai phương pháp thiết kế thí nghiệm và tối ưu hoá chính là phương pháp dựa trên hàm mục tiêu dạng đa thức bậc ≤ 2 và phương pháp dựa trên mạng neuron nhân tạo. Trong hai phương pháp này thì phương pháp dựa trên mạng neuron nhân tạo đã chứng minh được tính hiệu quả trong xử lý các bài toán phức tạp có nhiều biến độc lập và biến phụ thuộc mà quan hệ giữa chúng không thể mô tả được bằng hàm mục tiêu dạng đa thức bậc ≤ 2 . Chính vì vậy, trong nghiên cứu này phương pháp thiết kế thí nghiệm và tối ưu hoá dựa trên mạng neuron nhân tạo với sự hỗ trợ của phần mềm SAS JMP Pro 15 đã được lựa chọn để xác định điều kiện chiết xuất tối ưu. Kết quả tối ưu hoá cho hàm lượng BBR khoảng 1,29% và hiệu suất chiết BBR khoảng 73,16%. Kiểm chứng mô hình tại 1 điểm trong vùng tối ưu cho thấy kết quả thu được có độ chính xác cao so với dự đoán chứng tỏ mô hình

đã xây dựng có độ tin cậy cao. Phương pháp này đã chứng tỏ tính hiệu quả trong việc rút ngắn thời gian, giảm công sức cũng như chi phí do số thí nghiệm phải thực hiện giảm đi đáng kể. Việc xác định vùng tối ưu (hay không gian thiết kế) thay cho xác định điểm (hay chỉ một điều kiện chiết xuất) tối ưu mạng lại tính linh hoạt trong việc cải tiến và nâng cấp quy trình chiết xuất ở các bước nghiên cứu tiếp theo.

5. Kết luận

Quy trình chiết xuất hồi lưu để bào chế cao đặc phương thuốc Tan thống phong được tối ưu về hàm lượng và hiệu suất chiết berberin clorid sử dụng thiết kế thí nghiệm D-optimal và phương pháp mạng neuron nhân tạo. Các thông số của quy trình chiết xuất tối ưu được xác định gồm: Tỷ lệ dung môi/được liệu là 8 ml/g, nồng độ ethanol là 90%, thời gian chiết 90 phút, và số lần chiết là 3.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2020), *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh theo y học cổ truyền kết hợp y học cổ truyền và y học hiện đại* (Ban hành kèm theo Quyết định số 5013/QĐ-BYT, ngày 01/12/2020 của Bộ trưởng Bộ Y tế). 2. Chinese Pharmacopoeia Commission (2020), *Pharmacopoeia of the people's republic of China*. Vol. I, China Medical Science Press, 7, 34, 64, 109, 350, 441, 1571. 3. Naz H., Naz S., Miraj R., Zaheer A., Zam N., Mughail I. S., Khan A. W., Ishaq M., Sundas F., Hanif M.. (2021), The effect of berberine, a drug from chinese folk medicine, on serum and urinary uric acid levels in rats with hyperuricemia, *Cureus*, 13(2), doi:10.7759/cureus.13186. 4. Li Q., Huang Z., Liu D., Zhang J., Xie J., Chen J., Zeng H., Su Z., Li Y. (2021), Effect of berberine on hyperuricemia and kidney injury: A network pharmacology analysis and experimental validation in a mouse model, *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 3241 - 3254. 5. Liu Y. F., Wen C. Y., Chen Z., Wang Y., Huang Y., Tu S. H. (2016), Effects of berberine on NLRP3 and IL-1beta expressions in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation, *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2016/2503703. 6. Neag M. A., Mocan A., Echeverria J., Pop R. M., Bocsan C. I., Crisan G., Buzoianu A. D. (2018), Berberine: Botanical occurrence, traditional uses, extraction methods, and relevance in cardiovascular, metabolic, hepatic, and renal disorders, *Front. Pharmacol.*, 9, doi: 10.3389/fphar.2018.00557. 7. Lievense R. (2018), *Pharmaceutical quality by Design Using JMP®: Solving Product Development and Manufacturing Problems*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 8. Bui Hong Cuong, Do Hoang Yen, Pham Thai Ha Van (2022), Quantitative determination of berberine hydrochloride in the Tan Thong Phong viscous extracts by HPLC, *Journal of Medicinal Materials*, 27(2), 117 - 123. 9. AOAC (2016), *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, AOAC International, Rockville, MD, USA. 10. ICH (2005), *ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 11. ICH (2009), *ICH harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2)*, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

Tạp chí Dược liệu, tập 30, số 1/2025 (Trang 30 - 36)

TÁC DỤNG KHÁNG U CỦA CAO ĐỊNH CHUẨN BẦY LÁ MỘT HOA TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT BỊ GÂY U VÚ THỰC NGHIỆM BẰNG TẾ BÀO 4T1

Lý Hải Triều^{1,2}, Lê Thị Loan², Nguyễn Thị Thu², Đỗ Thị Thảo³, Trần Viễn Thông^{1,2}, Vũ Thị Diệp², Ngô Thị Thúy⁴, Nguyễn Minh Khởi², Đỗ Thị Hà^{2,*}

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu;

²Viện Dược liệu; ³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

⁴Bệnh viện Đại học Y Hà Nội;

*Email: hado.nimms@gmail.com

(Nhận bài ngày 02 tháng 01 năm 2025)

Tóm tắt

Bầy lá một hoa (*Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith) là dược liệu có tác dụng kháng ung thư nổi bật bởi các cơ chế phân tử khác nhau. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tính an toàn và tác dụng kháng u của cao định chuẩn từ thân rễ bầy lá một hoa (PPCE) trên mô hình chuột bị gây u vú bằng tế bào 4T1. Tính an toàn của PPCE được đánh giá thông qua thử nghiệm độc tính cấp đường uống. Tác dụng kháng u của PPCE được đánh giá trên chuột BALB/c gây khối u bằng cách tiêm tế bào ung thư vú 4T1 vào mô mỡ đệm tuyến vú. Chuột mang khối u được điều trị bằng PPCE ở liều uống 100, 200 và 400 mg/kg/ngày hoặc doxorubicin ở liều tiêm 5 mg/kg/ngày (3 ngày một lần) trong 28 ngày liên tục. Kết quả nghiên cứu cho thấy PPCE có độc tính cấp đường uống với LD₅₀ là 9,73 g/kg. PPCE ở liều 400 mg/kg làm giảm đáng kể thể tích khối u sau 21 và 28 ngày điều trị với phần trăm ức chế khối u trên 50% so với lô bệnh lý. PPCE ở liều 200 và 400 mg/kg làm giảm đáng kể trọng lượng khối u sau 28 ngày điều trị. Tuy nhiên, tác động của PPCE ở các liều khảo sát trên giải phẫu mô bệnh học khối u chưa rõ ràng. Các kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp bằng chứng về tác dụng kháng u vú của PPCE trên mô hình chuột BALB/c bị gây u vú bằng tế bào 4T1, cho thấy tiềm năng hướng đến nghiên cứu ứng dụng sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư vú của dược liệu này.

Từ khóa: Bầy lá một hoa, Cao định chuẩn, Kháng u, Ung thư vú, tế bào 4T1.

Summary

Antitumor Effect of Standardized Extract of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith in 4T1 Cell-Induced Breast Tumor Mouse Model

Paris polyphylla var. *chinensis* Smith is a medicinal herb with prominent anticancer effect by various molecular mechanisms. This study was conducted to evaluate the safety and antitumor effect of quantified dried extract of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Smith rhizomes (PPCE) in 4T1 cell-induced breast tumor mouse model. The safety of PPCE was