

Tối ưu hoá quy trình chiết acid oleanolic từ lá đinh lăng tại tỉnh Đắk Lắk

Lê Trung Khoảng^{1*}, Hoàng Thị Thu Huyền¹, Huỳnh Văn Chung¹,
Huỳnh Thị Như Quỳnh¹, Lê Minh Quân²

¹Khoa Dược, Đại học Buôn Ma Thuột

²Khoa Dược, Đại học Y - Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

The aim of study is to find optimal extraction conditions of oleanolic acid (OA) from the leaves of the *Polyscias fruticosa*. The factors were screened to choose which had noticeable effect. Then, the chosen factors would be optimized to find the optimal extraction conditions. For screening result, we used Min Run Res IV design: The temperature (50 - 80 °C) did not affect, and affected factors were: Solvents (water and ethanol 70%), ratio solvent/material (10/1 to 20/1), extraction time (30 - 180 mins), size of material (≤ 1 mm or ≤ 2 mm). The size of material was fixed at ≤ 1 mm, and the others were optimized with Box - Behnken design. The optimal conditions were determined: Ethanol 70%, 116 minutes extraction time and the ratio of solvent: material was 10/1.

Keywords: Oleanolic acid, *Polyscias fruticosa*, optimal, extraction conditions.

Đặt vấn đề

Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms), họ ngũ gia bì là dược liệu đã được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền, và hiện nay cũng đã được chứng minh những tác dụng dược lý theo y học hiện đại thông qua những thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* [1]. Bộ phận dùng của cây đinh lăng thường dùng là rễ, tuy nhiên những nghiên cứu về cây đinh lăng cho thấy hàm lượng acid oleanolic (OA) (chất chỉ dấu) trong lá đinh lăng cao hơn trong rễ nhiều lần [2]. Những nghiên cứu tác dụng dược lý của cao lá đinh lăng *in vivo* cho thấy cũng có nhiều tác dụng: Giảm lipid máu, bảo vệ gan, chống oxy hoá... [3-4]. Vì vậy, sử dụng lá đinh lăng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất, vừa có thể tận dụng nguồn dược liệu (thay vì chỉ lấy rễ) và nâng cao giá trị cho loại cây trồng này. Từ đó, chúng tôi nghiên cứu nhằm tối ưu hóa quy trình chiết acid oleanolic từ lá đinh lăng được trồng tại Đắk Lắk phục vụ sản xuất thuốc.

Chịu trách nhiệm: Lê Trung Khoảng

Email: trungkhoang@gmail.com

Ngày nhận: 30/11/2020

Ngày phản biện: 29/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Dược liệu

Lá đinh lăng được thu hái tại xã Ea Kpam, huyện Cư M'gar, tỉnh Đắk Lắk. Sau khi thu hái, lá được làm sạch và sấy ở 60 °C cho tới khi đạt hàm ẩm (< 13%). Xay thành bột với kích cỡ theo yêu cầu nghiên cứu, đựng trong túi PE và hút chân không để tránh ảnh hưởng của không khí và độ ẩm.

Hóa chất

Chất chuẩn acid oleanolic (Sigma-Aldrich), acetonitril, methanol, ethanol, chloroform, HCl, nước cất.

Phương pháp nghiên cứu

Điều chế cao chiết từ lá đinh lăng

Quy trình chiết xuất: Cho bột dược liệu vào bình nón nút mài, thêm dung môi và làm ẩm trong 2 giờ. Sau đó thêm dung môi, lắp sinh hàn hồi lưu và chiết nóng. Sau thời gian chiết, làm nguội, lọc lấy dịch chiết. Cô đặc dịch chiết ở nhiệt độ 70 °C cho đến khi thu được cao đặc. Tất cả các thí nghiệm đều được tiến hành với 50 g bột dược liệu.

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng tới quy trình chiết acid oleanolic từ lá đinh lăng

Trong quá trình chiết xuất, có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới hiệu suất chiết hoạt chất từ dược liệu. Nếu thiết kế tối ưu hoá với quá nhiều thông số sẽ cần rất nhiều các thử nghiệm, cũng như khó kiểm soát sai số trong quá trình thực nghiệm. Vì vậy, quá trình sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng là cần thiết để làm giảm các thí nghiệm trong giai đoạn tối ưu hoá. Các yếu tố khảo sát trong giai đoạn sàng lọc là: Nhiệt độ, dung môi, tỷ lệ dung môi/dược liệu, kích thước dược liệu, thời gian chiết.

Tối ưu hoá quy trình chiết acid oleanolic từ lá đinh lăng

Sau khi lựa chọn được các yếu tố ảnh hưởng, tối ưu hoá các thông số quy trình.

Phương pháp định lượng

Dựa trên hướng dẫn định lượng OA cao rễ đinh lăng của ĐĐVN V^[5]. Cân chính xác khoảng 1 g cao chiết cho vào bình nón 100 ml, thêm 40 ml HCl 4 M. Siêu âm trong 10 phút, rồi đun sôi hồi lưu trong 180 phút. Lọc lấy tủa và rửa tủa bằng nước cất cho tới khi trung tính (thử bằng giấy quỳ). Sấy tủa trong 120 phút, chiết tủa với 30 ml chloroform và đun sôi nhẹ trong 5 phút,

lọc lấy dịch chiết, lặp lại thêm 2 lần. Gộp dịch lọc, cô đến cạn. Hoà tan cần bằng methanol, thêm vừa đủ 50 ml. Định lượng bằng **HPLC** với các thông số: Cột C18 (25 cm X 4,6 mm), cột được nhồi pha tĩnh với kích thước hạt 5 µm; Pha động: Acetonitril-nước (80:20); Tốc độ dòng 1,3 ml/phút; Thể tích tiêm mẫu 10 µl; Đo tại bước sóng 205 nm.

Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày với phần mềm Excel 2016 và được sàng lọc, tối ưu với phần mềm Design expert 12.

Kết quả

Sàng lọc yếu tố ảnh hưởng

Sử dụng thiết kế Min Run Res IV với 5 yếu tố, mỗi yếu tố khảo sát 2 mức: Nhiệt độ (50 - 80 °C), dung môi (nước – cồn 70%), tỷ lệ dung môi/dược liệu (10/1 – 20/1), kích thước dược liệu (qua rây 1 mm hoặc rây 2 mm), thời gian chiết (30 – 180 phút). Biến phụ thuộc là tổng lượng OA thu được. Bảng thiết kế thí nghiệm: Bảng 1.

Bảng 1. Thiết kế sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng

STT	Nhiệt độ	Tỷ lệ	Thời gian	Dung môi	Kích thước	Tổng lượng OA thu được (g)
1	80	20	30	70	2	0,5265
2	50	10	180	70	1	0,7029
3	50	20	30	70	1	0,6711
4	80	10	180	0	2	0,1545
5	50	20	180	70	2	0,6273
6	80	20	30	0	2	0,1379
7	50	10	180	0	1	0,2843
8	50	10	30	70	2	0,3922
9	80	10	30	0	1	0,3014
10	50	20	30	0	2	0,1581
11	80	10	180	70	1	0,7905
12	80	20	180	0	1	0,3341

Kết quả phân tích các yếu tố ảnh hưởng được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Phân tích ANOVA của mô hình khảo sát yếu tố ảnh hưởng

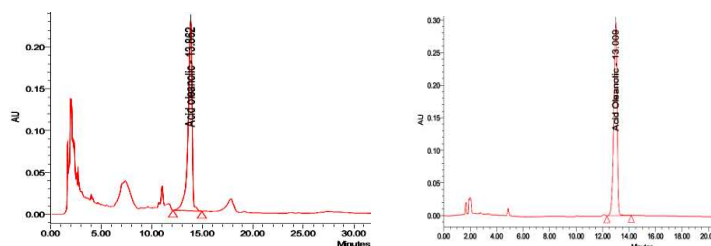
Nguồn	Tổng phương sai	Bậc tự do	Trung bình phương sai	Giá trị F	Giá trị P
Mô hình	0,3682	4	0,0921	71,6269	< 0,0001
B - Tỷ lệ	0,0046	1	0,0046	3,5528	0,1014
C - Thời gian	0,0075	1	0,0075	5,8014	0,0469
D - Dung môi	0,2909	1	0,2909	226,3075	< 0,0001
E - kích thước	0,0535	1	0,0535	41,5876	0,00035

Từ kết quả phân tích thu được cho thấy nhiệt độ (50 - 80 °C) không ảnh hưởng tới tổng lượng OA thu được; có 4 yếu tố ảnh hưởng tới quy trình chiết được mô tả là: Tỷ lệ dung môi/dược liệu, thời gian, dung môi, kích thước. Trong đó các biến ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê là:

Thời gian (càng lâu thì hoạt chất chiết được càng tăng), dung môi (độ cồn càng tăng thì hoạt chất chiết được tăng), kích thước (càng nhỏ thì hoạt chất chiết được càng tăng). Mô hình thu được có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$) với hệ số R^2 là 0,9625 và R^2 dự đoán là 0,9122.

Bảng 3. Hệ số ảnh hưởng và mức độ tin cậy của các yếu tố

Yếu tố	Hệ số ảnh hưởng	Bậc tự do	Sai số chuẩn	Độ tin cậy 95% dưới	Độ tin cậy 95% trên
Hằng số	0,6261	1	0,0103	0,6016	0,6505
B - Tỷ lệ	0,0214	1	0,0113	-0,0054	0,0482
C - Thời gian	0,0273	1	0,0113	0,0005	0,0541
D - Dung môi	0,1557	1	0,0103	0,1312	0,1802
E - kích thước	-0,0731	1	0,0113	-0,0999	-0,0463



Hình 1. Sắc ký đồ của cao chiết lá đinh lăng (trái) và acid oleanolic chuẩn (phải)

Tối ưu hoá các thông số được lựa chọn

Từ kết quả thu được, lựa chọn các thông số để tối ưu quy trình là: Tỷ lệ dung môi/dược liệu (10/1 – 20/1), thời gian chiết (30 - 180 phút), dung môi (nước – cồn 70%). Kích thước

dược liệu được cố định là qua rây 1 mm, nhiệt độ chiết được cố định tại 50 °C. Biến phụ thuộc là tổng lượng OA chiết được. Sử dụng mô hình Box - Behnken với 3 yếu tố, ở 3 mức và 3 thí nghiệm trung tâm.

Bảng 4. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hoá

STT	Dung môi	Tỷ lệ	Thời gian	Tổng lượng OA (mg)
1	0	15	180	326,82
2	70	15	180	741,62
3	70	15	30	814,30
4	0	20	105	341,71
5	35	20	180	474,78
6	35	20	30	686,34
7	35	15	105	715,24
8	35	10	180	708,78
9	70	20	105	789,55
10	0	10	105	314,55
11	70	10	105	796,75
12	35	10	30	631,78
13	0	15	30	249,04
14	35	15	105	687,46
15	35	15	105	727,14

Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 5.

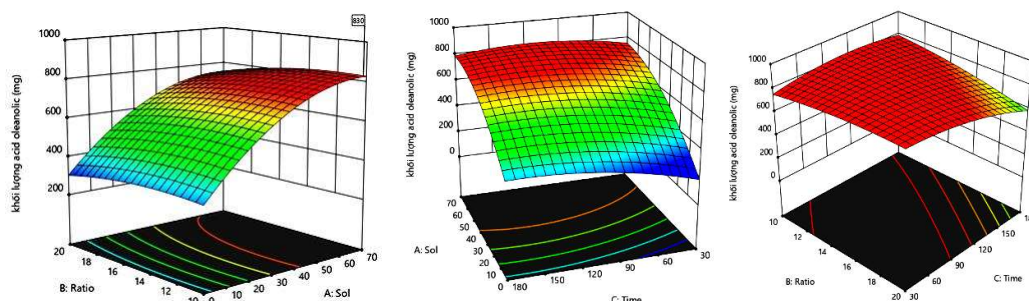
Bảng 5. Bảng phân tích ANOVA của mô hình tối ưu

	Tổng phương sai	Bậc tự do	Trung bình phương sai	Giá trị F	Giá trị P
Mô hình	551100	9	61.238,06	35,81	0,0005
A - Dung môi	456100	1	456.100	266,70	< 0,0001
B - Tỷ lệ	3179,8	1	3.179,80	1,86	0,2309
C - Thời gian	2095,14	1	2.095,14	1,23	0,3187
AB	295,32	1	295,32	0,1727	0,6950
AC	5659,57	1	5.659,57	3,31	0,1285
BC	20816,97	1	20.816,97	12,17	0,0175
A ²	53961,09	1	53.961,09	31,56	0,0025
B ²	2981,68	1	2.981,68	1,74	0,2439
C ²	11623,94	1	11.623,94	6,80	0,0478
Lack of Fit	7721,09	3	2.573,70	6,21	0,1419
Tổng	559700	14			

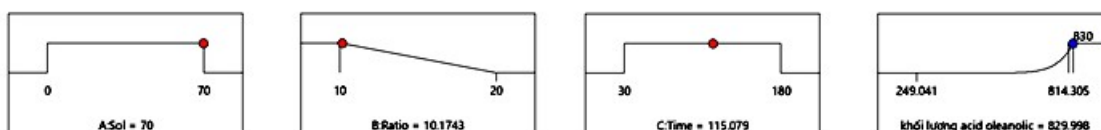
Phương trình mô hình thu được:

$$\text{Tổng lượng OA chiết được (mg)} = 709,95 + 238,76 \cdot A - 19,94 \cdot B - 16,18 \cdot C - 8,59 \cdot AB - 37,62 \cdot AC - 72,14 \cdot BC - 120,89 \cdot A^2 - 28,4 \cdot B^2 - 56,11 \cdot C^2$$

Phương trình mô tả có ý nghĩa thống kê so với dữ liệu đã cung cấp với $p = 0,0005$, R^2 hiệu chỉnh = 0,9572, R^2 dự đoán = 0,7759. Kiểm định F cho sự thiếu phù hợp mô hình (Lack of Fit) không có ý nghĩa thống kê, do vậy phương trình trên được lựa chọn để tối ưu hoá quy trình.



Hình 2. Bề mặt đáp ứng của khối lượng acid oleanolic thu được theo các biến đầu vào



Hình 3. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu

Phương án tối ưu được lựa chọn là: Dung môi cồn 70%, tỷ lệ dung môi/dược liệu 10/1, thời gian chiết 116 phút. Lượng OA thu được dự kiến là 830 mg. Tiến hành thực nghiệm với các thông số của quy trình chiết xuất tối ưu đã lựa chọn, thu được kết quả khối lượng OA trung bình là 821,3 mg (RSD là 1,55%), lệch so với kết quả dự đoán 1,05%.

Bàn luận

Với kết quả sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng cho thấy, các yếu tố ảnh hưởng tới khối lượng OA chiết được giảm dần theo thứ tự: Dung môi, kích thước và thời gian chiết. Acid oleanolic (khung triterpenoid sơ nước) trong đỉnh lãg, tồn tại ở dạng saponin bằng cách liên kết với các gốc đường (thân nước). Vì vậy, có thể chiết

saponin với dung môi là nước, tuy nhiên khi sử dụng hỗn hợp cồn - nước trong cùng điều kiện sẽ chiết được tổng lượng saponin nhiều hơn so với dung môi là nước [6].

Kích thước dược liệu ảnh hưởng nhiều tới lượng OA thu được, kích thước bột lá đinh lăng càng nhỏ thì lượng OA thu được càng nhiều vì tăng diện tích bề mặt tiếp xúc của dược liệu với dung môi, tăng tốc độ hòa tan của OA vào dung môi trong quá trình chiết xuất (theo định luật Fick). Tuy nhiên, nếu kích thước quá nhỏ có thể làm kết khối dược liệu sẽ làm dung môi khó lưu thông giữa các tiểu phân và làm giảm hiệu suất chiết. Lá đinh lăng khô có độ giòn rất cao, dễ vỡ vụn, dễ xay nhưng khó kiểm soát được tỷ lệ phân bố kích thước trong bột. Vì vậy, trong giới hạn khảo sát, chúng tôi thực nghiệm ở mức: Qua rây 2 mm và qua rây 1 mm.

Nhiệt độ (50 - 80 °C) không ảnh hưởng tới khối lượng OA thu được (và không xuất hiện trong phương trình mô tả), có thể do độ tan của hợp chất saponin trong dung môi lựa chọn thay đổi không nhiều trong khoảng nhiệt độ khảo sát. Do vậy, để tiết kiệm chi phí và dễ tiến hành, chúng tôi lựa chọn chiết ở 50°C.

Tỷ lệ dung môi/dược liệu ảnh hưởng tới khối lượng OA thu được (có mặt trong phương trình mô tả) nhưng không có ý nghĩa thống kê. Mặc dù theo lý thuyết, khi tăng lượng dung môi thì khối lượng chất chiết được tăng theo, tuy nhiên có thể do hàm lượng OA trong dược liệu thấp (1,84% trong dược liệu) nên với tỷ lệ dung môi là 10/1 có thể là đủ để hoà tan các chất tan được trong dung môi, vì vậy khi thay đổi tỷ lệ dung môi 10/1 – 20/1 có thể ảnh hưởng tới khối lượng OA (xu hướng tăng với hệ số ảnh hưởng nằm trong khoảng tin cậy: -0,0054 tới 0,0482) nhưng không có ý nghĩa thống kê.

Với các thông số được lựa chọn tiến hành tối ưu hoá: Kết quả thu được phương trình mô tả thu được theo hàm bậc 2, phương trình thu được mô tả tốt với dữ liệu đã cung cấp ($p < 0,0005$, R^2 hiệu chỉnh = 0,9572) và dự đoán tốt các kết quả (R^2 dự đoán = 0,7759). Lựa chọn tối ưu với các thông số đầu vào trong khoảng khảo sát, kết quả thu được lượng OA cao nhất là 842,12 mg. Tuy nhiên, các giải pháp đưa ra sử dụng tỷ lệ dung môi/dược liệu $\geq 15/1$, trong khi đó với hàm kỳ vọng được thêm vào là sử dụng

tỷ lệ dung môi ít nhất có thể, kết quả thu được khối lượng OA là 830 mg. Khối lượng OA thu được thấp hơn 1,44%, tuy nhiên lượng tỷ lệ dung môi/dược liệu giảm từ 15/1 về còn 10/1, tiết kiệm được nhiều dung môi, năng lượng cần để cô cao và dễ tiến hành hơn với lượng dung môi ít hơn.

Kết luận

Đã tối ưu hoá được quy trình chiết acid oleanolic từ lá đinh lăng và lựa chọn được thông số tối ưu theo hàm kỳ vọng là: Dung môi cồn 70%, tỷ lệ dung môi/dược liệu 10/1, thời gian chiết 116 phút, kích thước dược liệu là ≤ 1 mm và nhiệt độ chiết là 50 °C.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu (2004), "Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam", tập 1, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 793-796.
2. Nguyễn Thị Phương Thảo, Võ Thị Bạch Tuyết, Nguyễn Minh Đức (2011), "Xây dựng phương pháp định lượng acid oleanolic trong đinh lăng lá xẻ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 15 (1), tr. 593-597.
3. Nguyễn Trần Châu, Đỗ Mai Anh (2010), "Nghiên cứu tác dụng chống oxy hoá và hạ cholesterol của cao toàn phần chiết xuất từ lá đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 14 (2), tr. 96-100.
4. Trần Công Luận, Trịnh Minh Thiên, Hà Quang Thanh, Nguyễn Linh Nhân, Nguyễn Thị Thu Hương (2017), "Khảo sát tác dụng tăng lực của các chế phẩm từ cây đinh lăng *Polyscias fruticosa* (L.) Harms", *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học và Phát triển kinh tế, Trường Đại học Tây Đô*, (02), tr. 110-119.
5. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, NXB Y học, tr.1388-1389
6. Huỳnh Thị Mai Duyên, Dương Thị Hồng Thắm, Trần Chí Hải (2018), "Nghiên cứu quá trình trích ly saponin triterpenoid từ lá đinh lăng với sự hỗ trợ của dung môi", *Kỷ yếu Hội thảo khoa học Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Công nghệ thực phẩm TP. Hồ Chí Minh*, tr. 81-88.