

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết triterpenoid từ linh chi (*Ganoderma lucidum*) bằng chiết lỏng siêu tới hạn (Supercritical Fluid Extraction, SFE) ở quy mô phòng thí nghiệm

Nguyễn Thị Khánh Linh, Lê Tiến Khang
Phan Nguyễn Trường Thắng, Trần Việt Hùng*
Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

Ganoderma lucidum has been recognized as a precious fungus in both Chinese and Japanese traditional medicine for centuries. It contains many bioactive ingredients such as triterpenoids that proved to support anti-cancer effects. This study is about extraction of *Ganoderma lucidum* by using supercritical CO₂ and the modifier ethanol. It demonstrates that modified supercritical extraction is suitable for the extraction of *Ganoderma lucidum*. The advantage of modified supercritical extraction over nonmodified supercritical extraction was in the polarity component extraction and enhancement of the fluidity of extracts. Modifier supercritical extraction also has higher extraction yield and lower extraction temperature than those of conventional solvent extractions. Although the extraction yield seems to have not increased significantly when the pressure increased, the extraction pressure controlled the extraction selectivity of triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*.

Keywords: Triterpenoid, *Ganoderma lucidum*, Supercritical fluid extraction – SFE.

Đặt vấn đề

Linh chi (*Ganoderma lucidum*) là dược liệu đã được sử dụng từ lâu đời trên giới cũng như ở Việt Nam. Triterpenoid là một thành phần chính trong linh chi có tác dụng chống ung thư [5, 6], chất chống oxy hóa [2], bảo vệ gan [3] và giảm cholesterol máu [1]. Hiện nay các chế phẩm chứa linh chi được sử dụng hằng ngày như trà hòa tan, cao, viên nang,... nên nhu cầu về nguồn nguyên liệu có hàm lượng hoạt chất ổn định là rất cần thiết. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu áp dụng phương pháp chiết xuất triterpenoid trong linh chi bằng chất lỏng siêu tới hạn (Supercritical Fluid Extraction - SFE) [4]. Tuy nhiên ở Việt Nam vẫn còn áp dụng phương pháp truyền thống tồn tại nhiều hạn chế.

Chiết xuất triterpenoid từ linh chi bằng phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn được xem là hướng đi mới, áp dụng công nghệ hiện đại trong lĩnh vực chiết xuất dược liệu. Nghiên cứu này khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết linh chi trên quy mô phòng thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để xây dựng quy trình chiết xuất và bào chế cao linh chi giàu triterpenoid ở quy mô sản xuất.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Linh chi do Công ty Cổ phần phát triển Dược liệu Tây Nguyên cung cấp được đóng trong gói hút chân không hàn kín, đã đạt tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển Việt Nam V và USP 41.

Hóa chất, thuốc thử

Chất đối chiếu là acid ganoderic A (98,92%) – số lô: Gan01/0-8/14 của Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh và cặn chiết chuẩn – *Ganoderma lucidum* fruiting body dry extract –

Chịu trách nhiệm: Trần Việt Hùng
Email: tran.viethung168@gmail.com
Ngày nhận: 15/12/2020
Ngày phản biện: 13/01/2021
Ngày duyệt bài: 19/02/2021

số lô: F012B0 của USP. Các hóa chất, thuốc thử đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

Dụng cụ, trang thiết bị

Dụng cụ thủy tinh các loại. Cân phân tích Mettler Toledo AT – 200, d = 0,1 mg, Mettler Toledo XP86, d = 0,002 mg; Bể siêu âm gia nhiệt Elma Sonic, Đức; Bếp cách thủy Memmert WMB 40, Đức; Bể điều nhiệt Thermostate Jeio Tech, Hàn Quốc; Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu-UFLC-SPD-M20A detector PDA, Nhật Bản; Cột C18 150 mm x 2 mm x 3 µm, Phenomenex, Mỹ; Tủ sấy Heraeus VT 6025, Đức; Máy chiết xuất siêu tới hạn Speed SFE system model 7071, Applied separations, Mỹ,...

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng trong chiết xuất linh chi bằng phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn

Khảo sát độc lập để lựa chọn các yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả chiết xuất (% cặn và hàm lượng triterpenoid toàn phần). Quá trình chiết SFE sử dụng một tỷ lệ nhỏ dung môi phân cực đó là ethanol, các yếu tố được khảo sát gồm:

- *Dung môi chiết:* Ethanol 30%, 70% hoặc 96%.
- *Tốc độ dòng của dung môi chiết:* 0,1 ml/phút; 0,2 ml/phút; 0,3 ml/phút; 0,4 ml/phút và 0,5 ml/phút.
- *Nhiệt độ chiết:* 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C.
- *Áp suất chiết:* 200 bar, 250 bar, 300 bar, 350 bar, 400 bar, 500 bar và 600 bar.
- *Thời gian chiết:* 1 giờ; 2 giờ; 2,5 giờ và 3 giờ.

Xử lý dịch chiết: Dịch chiết sau khi thu được được cô tới cặn trên bếp cách thủy, xác định khối lượng cặn thu được.

Định lượng triterpenoid toàn phần trong linh chi bằng HPLC

Dung dịch cao linh chi chuẩn: Cân khoảng 40 mg cao linh chi chuẩn, hòa trong 5 ml ethanol. Siêu âm trong vòng 30 phút. Ly tâm lấy dịch lọc, lọc qua màng lọc 0,2 µm.

Dung dịch chuẩn: Dung dịch acid ganoderic A 0,1 mg/ml trong methanol.

Dung dịch thử: Hòa tan 50,0 mg cặn thu được trong BDM 5 ml, thêm 2 ml ethanol, siêu âm 15 phút, thêm ethanol vừa đủ thể tích. Lọc qua đầu lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc kí Gemini C18 (150 mm x 2,1 mm x 3 µm), nhiệt độ 25 °C, bước sóng phát hiện 257 nm, tốc độ dòng: 0,36 ml/phút, thể tích tiêm 5 µl, tốc độ dòng 0,36 ml/phút. Chương trình gradient pha động sử dụng hỗn hợp acetonitrile (A) – acid phosphoric 0,075% (B) với tỉ lệ trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient và tỷ lệ pha động

<i>Thời gian (min)</i>	<i>Pha động A (%)</i>	<i>Pha động B (%)</i>
0	80,0	20,0
3	73,5	26,5
34	73,5	26,5
52	61,5	38,5
53	80,0	20,0
58	80,0	20,0
60	100,0	0
62	100,0	0
65	80,0	20,0
70	80,0	20,0

Dựa vào sắc ký đồ dung dịch cặn chiết chuẩn, xác định các pic của các triterpenoid trong linh chi. Hệ số đáp ứng của các triterpenoid trong linh chi được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Hệ số đáp ứng của các triterpenoid trong linh chi

<i>Chất phân tích</i>	<i>Hệ số đáp ứng</i>
<i>Acid ganoderenic C</i>	0,51
<i>Acid ganoderic C</i>	1,05
<i>Acid ganoderic G</i>	1,18
<i>Acid ganoderenic B</i>	0,45
<i>Acid ganoderic B</i>	1,10
<i>Acid ganoderic A</i>	1,00
<i>Acid ganoderic H</i>	1,54
<i>Acid ganoderenic D</i>	0,51
<i>Acid ganoderic D</i>	1,08
<i>Acid ganoderic F</i>	1,45

Hàm lượng triterpenoid toàn phần trong cặn được tính theo acid ganoderic A.

Thiết kế thí nghiệm: Thực hiện khảo sát ban đầu với các yếu tố được cố định: lượng dược liệu 10 g linh chi được xay mịn, nhiệt độ dòng CO₂ đầu vào - 5 °C, nhiệt độ van: 80 °C.

Xem xét mối liên quan giữa các yếu tố khảo sát và khối lượng cặn thu được và hàm lượng

triterpenoid toàn phần. Sau đó, lựa chọn được điều kiện phù hợp nhất.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng trong chiết xuất linh chi bằng phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn

Ảnh hưởng dung môi chiết: Khối lượng cặn và hàm lượng triterpenoid toàn phần tăng khi tăng nồng độ ethanol. Ethanol 96% và CO₂ siêu tới hạn giúp tăng khả năng phân cực của dung môi chiết xuất, làm tăng hiệu quả chiết triterpenoid.

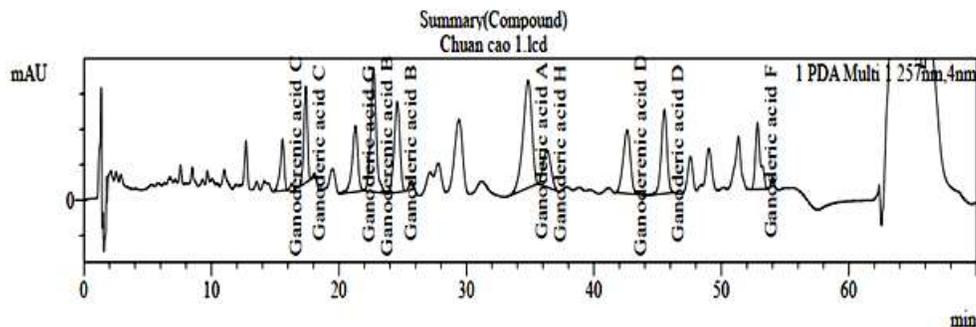
Ảnh hưởng của tốc độ dòng của dung môi chiết: Tốc độ dòng 0,3 ml/phút, thu được khối lượng cặn lớn nhất và hàm lượng triterpenoid toàn phần tương đối cao. Khi tăng tốc độ dòng thì khối lượng cặn và hàm lượng triterpenoid không tăng nữa. Do đó, tốc độ 0,3 ml/phút

là phù hợp để tiến hành khảo sát trên lượng lớn.

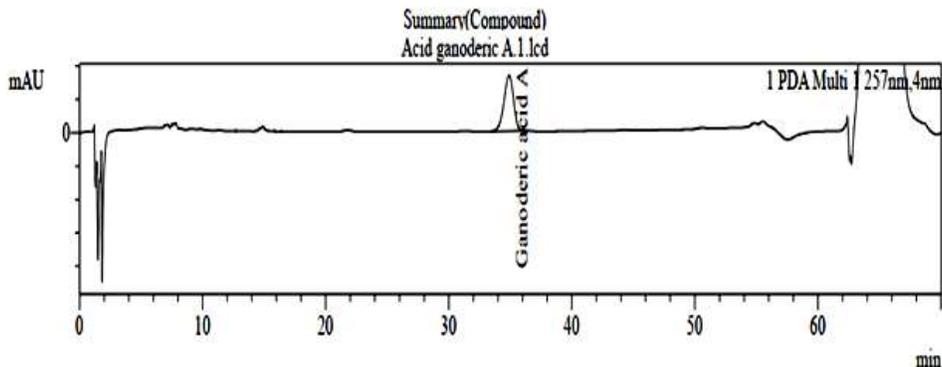
Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết: Ở 40 °C, thu được lượng cặn và hàm lượng triterpenoid lớn nhất. Sau đó thì giảm xuống. Chọn nhiệt độ chiết là 40 °C để tiến hành khảo sát trên lượng lớn.

Ảnh hưởng của áp suất chiết: Tại áp suất 200 bar, thu được khối lượng cặn lớn nhất, hàm lượng triterpenoid toàn phần thấp hơn ở các mức áp suất cao hơn. Tuy nhiên khi thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm, ở các mức áp suất cao thì không ổn định và khó khi nâng lên cỡ mẫu lớn hơn. Chọn áp suất 200 bar để tiến hành khảo sát trên lượng lớn.

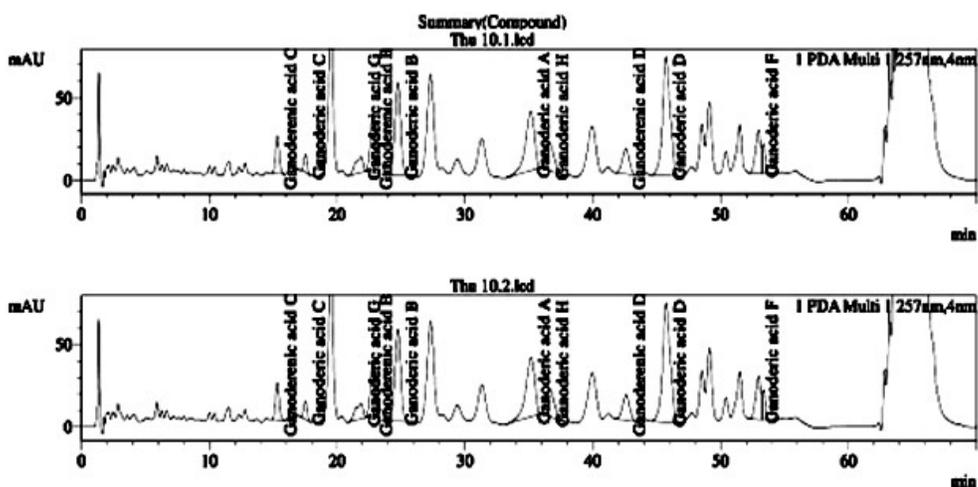
Ảnh hưởng thời gian chiết: Hàm lượng triterpenoid toàn phần tăng dần và cao nhất sau 2,5 giờ chiết. Sau 3 giờ thì không còn thấy vết của acid ganoderic A.



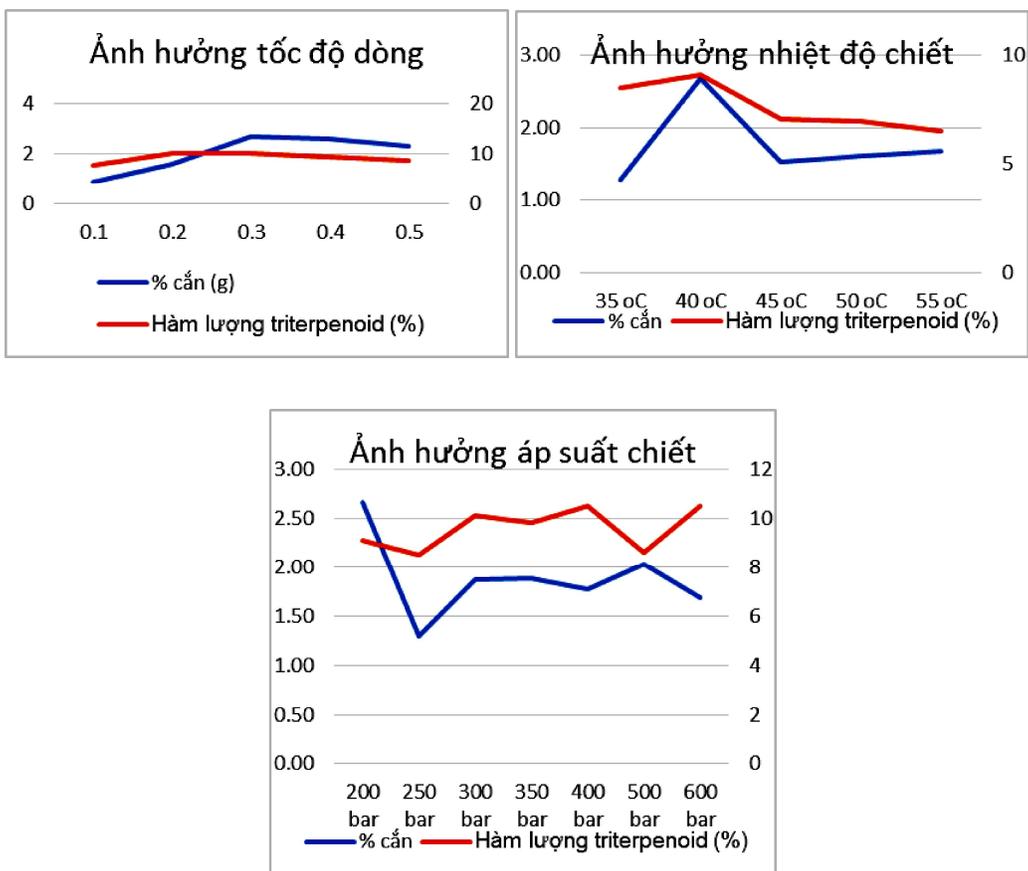
Hình 1. Sắc ký đồ dung dịch cao linh chi chuẩn



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn acid ganoderic A



Hình 3. Sắc ký đồ thu được của dung dịch chiết sau 3 giờ ở điều kiện tốc độ ethanol 96% là 0,3 ml/phút, nhiệt độ chiết 40 °C và áp suất chiết 200 bar



Hình 4. Biểu đồ ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu quả chiết xuất

Nhận xét: Điều kiện phù hợp được chọn để tiến hành chiết được lượng lớn có nhiệt độ CO₂ đầu vào -5 °C, nhiệt độ chiết 40 °C, nhiệt độ van 80 °C, áp suất chiết 200 bar, dung môi phối trộn là ethanol 96% với tốc độ dòng 0,3 ml/phút. Với điều kiện trên, hiệu suất chiết xuất thu được là 98,5%.

So sánh phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn với phương pháp chiết xuất cổ điển (phương pháp ngâm)

Chúng tôi thử so sánh chiết SFE với phương pháp ngâm linh chi (10 g) trong ethanol 96% trong 96 giờ, sau đó cất quay thu hồi dung môi tới cạn. Kết quả định lượng triterpenoid toàn phần được ghi trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn và phương pháp ngâm

	Phương pháp ngâm	HL triterpenoid TP (%)	Phương pháp SFE	HL triterpenoid TP (%)
Thời gian chiết	96 giờ	4,98	3 giờ	9,06
Dung môi chiết (ethanol 96%)	450 ml		54 ml	

Nhận xét: Kết quả cho thấy phương pháp chiết lỏng siêu tới hạn có ưu điểm hơn về mặt thời gian (giảm 32 lần) và dung môi hao tổn (giảm 8,3 lần) so với phương pháp truyền thống. Hơn nữa, hàm lượng triterpenoid thu được gần như gấp đôi.

Kết luận

Đây là nghiên cứu bước đầu khảo sát và xác định mối liên hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng đến chiết xuất triterpenoid toàn phần trong dược liệu linh chi (dung môi phối hợp, tốc độ dòng của dung môi phối hợp, nhiệt độ chiết, áp suất chiết, thời gian chiết) và hàm lượng triterpenoid toàn phần trong cặn thu được. Từ những khảo sát chiết triterpenoid bằng SFE ở quy mô phòng thí nghiệm sẽ có những định hướng cho chiết và bào chế cao linh chi giàu triterpenoid. Thông số chiết siêu tới hạn phù hợp cho hàm lượng triterpenoid toàn phần đạt 9,13%, hiệu suất chiết triterpenoid toàn phần đạt 98,5% với các điều kiện dung môi ethanol 96%, tốc độ dòng 0,3 ml/phút, áp suất chiết 200 bar, nhiệt độ chiết 40 °C. Các thông số chiết xuất thu được đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu suất chiết, tiết kiệm được thời gian và dung môi hao tổn so với các phương pháp truyền thống, làm cơ sở xây dựng quy trình chiết xuất linh chi ở quy mô sản xuất.

Tài liệu tham khảo

- Berger A., Rein D., Kratky E., Monnard I, Hajjaj H, Meirim I (2004), "Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs", *Lipids Health Dis*, 3, 2.
- Chen D. H. Shiou W. Y., Wang K. C., editors. et al. (1999), "Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*", *J. Chin Chem. Soc.*, 46, pp. 47–51.
- Kim H. W. Kim B. K. (1999), "Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) P. Karst. (*Aphyllorphoromycetidae*)", *Int. J. Med. Mushrooms*, 1, pp. 121-138.
- Ruey Chi Hsu * Bin Hwae Lin, and Chi Wei Chen (2001), "The study of supercritical carbon dioxide extraction for *Ganoderma lucidum*", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40, pp. 4478 - 4481.
- Wang S. Y. Hsu M. L., Hsu H. C., et al. (1997), "The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes", *International Journal of Cancer*, 70 (6), pp. 699 - 705.
- Yuen J. W Gohel M. D. (2005), "Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence", *Nutr. Cancer*, 53, pp. 11-17.