ISSN 1859 - 4735

TẠP CHÍ DƯỢC LIỆU

SỐ 6 - 2021
TẬP 26

Journal of Medicinal Materials-Hanoi

MỤC LỤC TẬP 26, SỐ 6/2021
(Trang 263 - 326)

CONTENTS VOL. 26 (6), 2021
(Pages 263 - 326)

Trang	TỔNG QUAN	Page	REVIEW
265	**Tổng quan về công nghệ tinh chế, làm giàu hoạt chất trong sản xuất cao dược liệu** - *Trần Trọng Biên, Trần Thị Tuyết, Đào Anh Hoàng, Nguyễn Thị Sen*	265	**Bioactive Ingredients Purification and Enrichment Technologies in Manufacturing of Herbal Extracts: A Mini Review** - *Tran Trong Bien, Tran Thi Tuyet, Dao Anh Hoang, Nguyen Thi Sen*
	NGHIÊN CỨU KHOA HỌC		**SCIENTIFIC RESEARCH**
277	**Các triterpenoid từ phân đoạn ethyl acetat nấm *Ganoderma cochlear* (Nees) Merr., họ Ganodermataceae** - *Nguyễn Thị Duyên, Trần Thị Tuyết, Hoàng Đức Mạnh, Lê Thành Nghị, Nguyễn Phương Đại Nguyên, Nguyễn Văn Tài*	277	**Triterpenoids from the Ethyl Acetate Fraction of *Ganoderma cochlear* (Nees) Merr.** - *Nguyen Thi Duyen, Tran Thi Tuyet, Hoang Duc Manh, Le Thanh Nghi, Nguyen Phuong Dai Nguyen, Nguyen Van Tai*
282	**Thành phần hóa học của tinh dầu và phân đoạn *n*-hexan phần trên mặt đất chùa dù** - *Hoàng Thị Diệu Hương, Lê Thị Kim Vân, Nguyễn Văn Chính, Đỗ Thị Hà*	282	**Chemical Constituents of the Essential Oil and *n*-Hexane Fraction from the Aerial Parts of *Elsholtzia penduliflora* W.W. Smith** - *Hoang Thi Dieu Huong, Le Thi Kim Van, Nguyen Van Chinh, Do Thi Ha*
287	**Các hợp chất asterosaponin từ loài sao biển *Pentaceraster regulus* và tác dụng gây độc tế bào ung thư *in vitro*** - *Lê Thị Viên, Trần Thị Hồng Hạnh, Trần Hồng Quang, Đỗ Thị Thảo, Hà Văn Oanh, Nguyễn Phương Thảo, Nguyễn Xuân Cường, Nguyễn Hoài Nam*	287	**Asterosaponins from the Starfish *Pentaceraster regulus* and their *in vitro* Cytotoxic Effects Against Cancer Cells** - *Le Thi Vien, Tran Thi Hong Hanh, Tran Hong Quang, Do Thi Thao, Ha Van Oanh, Nguyen Phuong Thao, Nguyen Xuan Cuong, Nguyen Hoai Nam*
293	**Một số hợp chất lignan và megastigman phân lập từ thân cây dứa dại** - *Trương Thị Liên, Đỗ Hoàng Giang, Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Thị Luyến*	293	**Lignan and Megastigmane Constituents from *Pandanus tectorius*** - *Truong Thi Lien, Do Hoang Giang, Nguyen Tien Dat, Nguyen Thi Luyen*
298	**Định lượng saponin trong sâm Việt Nam trồng tại Lâm Đồng bằng HPLC-UV-ELSD** - *Vũ Huỳnh Kim Long, Nguyễn Trường Huy, Lê Thị Hồng Vân, Ngô Thị Mỹ Duyên, Trần Mộng Kha, Nguyễn Minh Đức*	298	**Quantitative Analysis of Saponins in Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.) Cultivated in Lam Dong Province by HPLC-UV-ELSD** - *Vu Huynh Kim Long, Nguyen Truong Huy, Le Thi Hong Van, Ngo Thi My Duyen, Tran Mong Kha, Nguyen Minh Duc*
304	**Xây dựng quy trình định lượng stachyose trong cao toàn phần sùng thảo bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò khối phổ** - *Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Viết Tịnh, Đặng Thị Xuân Quyên, Nguyễn Thị Vy Phương, Võ Thị Bạch Huệ, Phan Thanh Dũng, Phan Văn Hồ Nam*	304	**The Development of UPLC-MS Method for the Quantification of Stachyose in *Stachys affinis* Total Extract** - *Nguyen Thi Bich Ngoc, Nguyen Viet Tinh, Dang Thi Xuan Quyen, Nguyen Thi Vy Phuong, Vo Thi Bach Hue, Phan Thanh Dung, Phan Van Ho Nam*
309	**Xây dựng phương pháp phân tích định lượng tilirosid trong dược liệu cối xay ở Việt Nam bằng HPLC-UV** - *Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Thị Hằng, Hoàng Thị Tuyết, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Minh Khởi*	309	**Development and Validation of HPLC-UV for Quantitative Determination of Tiliroside in *Herba Abutili indici*** - *Nguyen Thi Ha Ly, Nguyen Thi Hang, Hoang Thi Tuyet, Nguyen Thi Phuong, Nguyen Minh Khoi*
316	**Tác dụng bảo vệ thần kinh của đương quy Nhật Bản, dành dành và nguru tất trên mô hình thiếu oxy và glucose trên lát cắt hồi hải mã nuôi cấy** - *Lê Thị Xoan, Nguyễn Thị Thanh Loan, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Văn Tài*	316	**Neuroprotective Effect of *Angelica acutiloba*, *Gardenia jasminoides* and *Achyranthes bidentata* in Organotypic Hippocampal Slice Cultures Exposed to Oxygen and Glucose Deprivation** - *Le Thi Xoan, Nguyen Thi Thanh Loan, Pham Thi Nguyet Hang, Nguyen Van Tai*
322	**Nghiên cứu tác dụng chống viêm và độc tính cấp trên thực nghiệm của sản phẩm Cao lỏng tiêu viêm HD** - *Trần Hồng Linh, Vũ Duy Phong, Đào Thị Hoài Thu, Phạm Văn Huấn, Nguyễn Thùy Dương*	322	**Anti-Inflammatory Effects and Acute Oral Toxicity of "HD Anti-inflammatory Herbal Liquid" in Animal Models** - *Tran Hong Linh, Vu Duy Phong, Dao Thi Hoai Thu, Pham Van Huan, Nguyen Thuy Duong*

Tạp chí Dược liệu, tập 26, số 6/2021 (Trang 265 - 277)

TỔNG QUAN VỀ CÔNG NGHỆ TINH CHẾ, LÀM GIÀU HOẠT CHẤT TRONG SẢN XUẤT CAO DƯỢC LIỆU

Trần Trọng Biên[1,*], Trần Thị Tuyết[2], Đào Anh Hoàng[3], Nguyễn Thị Sen[3,4]

[1]Đại học Dược Hà Nội; [2]Đại học Đại Nam; [3]Viện dược liệu; [4]Đại học Thành Đô

*Email: trantrongbien@gmail.com

(Nhận bài ngày 01 tháng 9 năm 2021)

Tóm tắt

Cao dược liệu là một sản phẩm chiết xuất đặc trưng, quan trọng và phổ biến nhất từ dược liệu. Một quy trình sản xuất cao dược liệu thường gồm các bước: xử lý dược liệu, chiết xuất, loại dung môi (cô đặc), tinh chế loại tạp chất, làm khô, điều chỉnh hàm lượng chất đánh dấu (marker) và hoàn chỉnh chế phẩm. Trong đó, giai đoạn tinh chế đóng vai trò quan trọng trong việc loại bỏ tạp chất và làm giàu hoạt chất để cao dược liệu đáp ứng các yêu cầu tinh khiết, an toàn và hiệu quả trong ứng dụng dược phẩm. Nghiên cứu này cung cấp các thông tin tổng quan về các phương pháp tinh chế, áp dụng trong sản xuất cao dược liệu giàu hoạt chất như kết tủa, hấp phụ, chiết phân bố lỏng-lỏng, kết bông, tách màng và trao đổi ion. Mục đích của nghiên cứu là đóng góp kiến thức và kỹ thuật để nâng cao chất lượng cao dược liệu.

Từ khóa: *Cao dược liệu, Chiết xuất, Tinh chế, Làm giàu hoạt chất, Nâng cao chất lượng.*

Summary

Bioactive Ingredients Purification and Enrichment Technologies in Manufacturing of Herbal Extracts: A Mini Review

Herbal extract is a characteristic, important and the most popular product extracted from medicinal plants. A typical procedure of herbal extracts manufacturing comprises following steps: herbs pretreament, extraction, solvent removal, purification, concentration, drying, adjustment of bioactive markers content and completion of preparation. In the manufacturing process, purification is a very crucial stage being responsible for removing impurities and enriching bioactive compounds from extracts, which is necessary for producing extracts meeting the purity, safety and efficacy requirements in pharmaceutical applications. This mini review provided useful information about highly potential purification methods applying in manufacuring of bioactive ingredients-enriched extracts such as precipitation, adsorption, liquid-liquid extraction, flocculation, membrane separation and ion exchange. The aim of this study is contributing knowledge and techniques to the improvement of herbal extracts quality.

Keywords: *Herbal extracts, Extraction, Purification, Enriching active constituents, Quality improvement.*

1. Đặt vấn đề

Theo Dược điển Việt Nam 5, cao dược liệu (cao thuốc) là chế phẩm được chế bằng cách cô hoặc sấy đến thể chất quy định các dịch chiết thu được từ dược liệu thực vật hay động vật với dung môi thích hợp [1]. Trong đó, cao dược liệu có nguồn gốc thực vật phổ biến hơn cả. Hiện nay, cao dược liệu ngày càng được dùng để thay thế bột dược liệu trong sử dụng và sản xuất các dạng thuốc do các ưu điểm: dễ sử dụng, giảm liều, thuận lợi khi bào chế, cải thiện sinh khả dụng, tăng độ ổn định và đặc biệt dễ tiêu chuẩn hóa chất lượng. Một quy trình sản xuất cao dược liệu thường gồm các bước: xử lý dược liệu (ví dụ: làm khô, xay nghiền, bất hoạt enzym, loại tạp, làm trương nở), chiết xuất, loại dung môi (cô đặc), tinh chế loại tạp chất, làm khô, điều chỉnh hàm lượng chất đánh dấu (marker) và hoàn chỉnh chế phẩm [2]. Các dung môi hay sử dụng để điều chế cao dược liệu là nước và hỗn hợp cồn-nước do tính an toàn và sẵn có, mặc dù các dung môi khác như aceton, ethyl acetat, ether… cũng có thể được cân nhắc trong trường hợp nhất định [2],[3],[4]. Thực tế hiện nay ở Việt Nam, các quy trình sản xuất cao dược liệu nói riêng và các thành phẩm từ dược liệu nói chung (thuốc, thực phẩm chức năng) còn đơn giản, dược liệu chủ yếu được chiết xuất bằng nước và tinh chế bằng phương pháp lắng gạn. Hệ quả, cao dược liệu đa phần là cao thô lẫn nhiều tạp chất, hàm lượng hoạt chất thấp nên rất kém hiệu quả, kém ổn định và thiếu an toàn. Ngược lại, ở những nước tiên tiến trên thế giới, dược liệu được chiết xuất chọn lọc bằng đa dạng các dung môi khác nhau dựa trên những hiểu biết rõ về thành phần hóa học và đặc biệt là các hoạt chất chính, các chất đánh dấu đặc trưng của dược liệu. Đặc biệt, nhiều công nghệ tinh chế dịch chiết được áp dụng rộng rãi trong quy trình sản xuất, cao dược liệu có chất lượng tốt hơn và dễ tiêu chuẩn hóa hơn. Dược điển Trung Quốc (CP) có rất nhiều chuyên luận cao dược liệu và các sản phẩm chiết xuất khác từ dược liệu (đơn dược liệu hoặc bài thuốc) áp dụng các phương pháp tinh chế trong quy trình sản xuất [5], Dược điển Anh (BP) và Dược điển châu Âu (EP) cũng có nhiều chuyên luận cao dược liệu tinh chế như cao khô bạch quả tinh chế (*Ginkgo biloba* L.), cao khô kế sữa tinh chế (*Silybum marianum* L. Gaertn.), cao khô việt quất tinh chế (*Vaccinium myrtillus* L.) [4],[6].

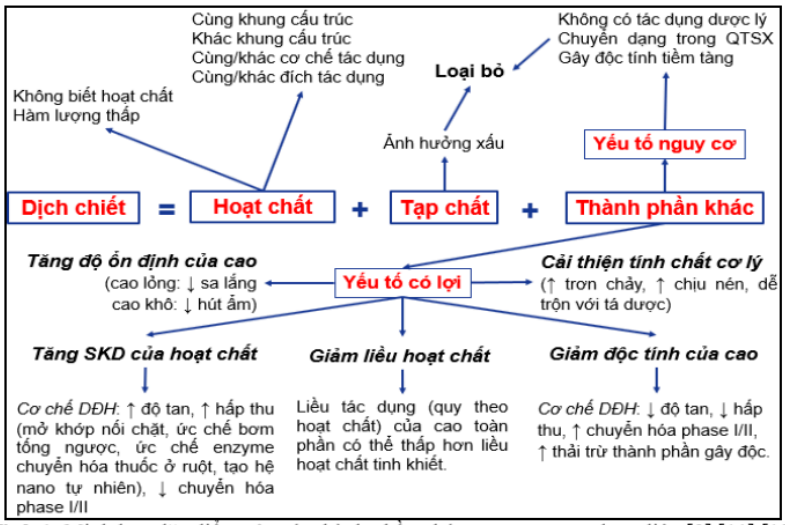
Bài tổng quan này hệ thống một số phương pháp tinh chế triển vọng hiện nay, áp dụng trong sản xuất cao dược liệu giàu hoạt chất có nguồn gốc thực vật như kết tủa, hấp phụ, chiết phân bố

lỏng-lỏng, kết bông, tách màng, trao đổi ion. Các phương pháp tinh chế được giới thiệu về nguyên lý, thiết bị, kỹ thuật thực hiện, các thông số quy trình trọng yếu, các thuộc tính chất lượng, ưu nhược điểm và hướng nghiên cứu cải tiến. Mục đích của nghiên cứu là góp phần nâng cao chất lượng, giúp tiêu chuẩn hóa và kiểm soát chất lượng trong quy trình sản xuất cao dược liệu.

2. Ảnh hưởng của tạp chất và chiến lược tinh chế dịch chiết

Việc lựa chọn dung môi, phương pháp, thiết bị và các điều kiện chiết xuất hợp lý giúp tăng hiệu suất chiết, dịch chiết sạch và lẫn ít tạp chất. Tuy nhiên trong thực tế sản xuất, ít dung môi chiết có tính chọn lọc hòa tan cao với hoạt chất nên dịch chiết dược liệu thường lẫn nhiều tạp chất có cấu trúc và tính chất đa dạng, phức tạp, khó loại bỏ. Chúng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn các thành phần: gôm, pectin, chất nhầy, đường, tinh bột, tannin, protein, sáp, nhựa, dầu béo, chất màu [7]. Tạp chất gây khó khăn cho việc xử lý dịch chiết (cô đặc, tiệt khuẩn, làm khô), làm giảm hiệu suất và tăng chi phí sản xuất. Cao dược liệu lẫn nhiều tạp chất sẽ không đạt chất lượng về cảm quan, hàm lượng hoạt chất, độ ổn định, độ tinh khiết, tính an toàn. Sử dụng cao thô sẽ khó đưa vào các dạng bào chế do liều dùng lớn, khó sản xuất (khó trộn đều, khó tạo hạt, khó sấy, khó dập viên), chế phẩm kém ổn định (hút ẩm, thay đổi mùi vị, sa lắng) và/hoặc giảm hiệu lực (giảm giải phóng hoạt chất, giảm hấp thu). Ví dụ, viên hoàn giọt là một trong những dạng bào chế tiềm năng sử dụng nguyên liệu chủ yếu là cao dược liệu, tuy nhiên do khối lượng viên nhỏ nên cao dược liệu cần được tinh chế tốt để giảm liều. Một số chế phẩm vô khuẩn từ dược liệu như thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt yêu cầu tính an toàn rất cao, do đó cao dược liệu cần được tinh chế tốt để loại bỏ tạp chất, tăng tính an toàn.

Có thể chia các thành phần của dịch chiết dược liệu thành 3 nhóm để xác định các chiến lược, nguyên tắc tinh chế phù hợp trong quy trình sản xuất cao dược liệu (**Hình 1**): ***(1)*** nhóm các hoạt chất tạo nên tác dụng của cao, cần thu hồi trong quá trình tinh chế. Một đặc trưng của cao dược liệu là thường chứa nhiều nhóm hoạt chất khác nhau, hàm lượng thấp và không ổn định, các đặc điểm về độ tan, độ ổn định và sinh khả dụng đa dạng, điều này gây khó khăn trong việc lựa chọn phương pháp tinh chế phù hợp; ***(2)*** nhóm các tạp chất đã biết rõ độc tính, cần loại bỏ; và ***(3)*** nhóm các thành phần khác. Với nhóm này, nếu chúng không có tác dụng dược lý, gây bất lợi cho quá trình sản xuất, ảnh hưởng xấu đến chất lượng cao dược liệu và đặc biệt có độc tính tiềm tàng (ví dụ: các saccharid (glucose, fructose, sucrose, raffinose) trong rễ đan sâm không được xem là hoạt chất, chúng bị chuyển hóa thành chất có độc tính nguy hiểm trong thuốc tiêm là 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyd khi cô đặc và tiệt khuẩn dịch chiết ở nhiệt độ cao [8]), cũng cần loại bỏ. Ngược lại, nếu những thành phần này, mặc dù không có tác dụng dược lý, nhưng lại đóng vai trò như là các tá dược có lợi trong cao dược liệu thì chúng nên được thu hồi trong quá trình sản xuất [9]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, cao tinh chế thể hiện tác dụng khác không đáng kể so với cao thô, thậm chí giảm [10]; nhiều hoạt chất giảm hoặc thậm chí mất tác dụng sau khi phân tách và tinh chế từ cao dược liệu [11].



Hình 1. Minh họa đặc điểm của các thành phần phức tạp trong cao dược liệu [9],[11],[12]
(Chú thích: DĐH: Dược động học, QTSX: Quy trình sản xuất, SKD: Sinh khả dụng, ↑: tăng, ↓: giảm)

Do đó, căn cứ vào tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm, cần tiến hành tinh chế dịch chiết theo nguyên tắc: loại tối đa tạp chất, đồng thời đảm bảo độ ổn định của hoạt chất, hiệu suất quy trình, chi phí và tính an toàn sản xuất, đặc biệt cần giữ được tác dụng của cao. Việc lựa chọn phương pháp tinh chế phù hợp dựa trên các hiểu biết toàn diện về bản chất, tính chất lý hóa, độ ổn định của hoạt chất cũng như số lượng, thành phần, đặc điểm của tạp chất và nhiều yếu tố khác liên quan đến thiết bị, môi trường và chi phí. Các đặc tính quan trọng của hoạt chất bao gồm độ tan, độ ổn định, tính acid-base, khả năng điện ly, kích thước và trọng lượng phân tử.

3. Các phương pháp tinh chế, làm giàu hoạt chất

3.1. Phương pháp kết tủa

Kết tủa là một trong các phương pháp tinh chế cơ bản nhất trong sản xuất cao dược liệu, phương pháp dựa vào sự khác nhau về độ tan của tạp chất và hoạt chất trong những điều kiện thích hợp để loại tạp chất. Một số kỹ thuật được sử dụng như thay đổi nhiệt độ, điều chỉnh pH, thay đổi dung môi.

+ *Kết tủa bằng nhiệt:* Tiến hành đun nóng và cô đặc dịch chiết đến còn 1/2 - 1/4 thể tích ban đầu, để lắng chỗ mát, gạn, lọc. Cách này giúp loại protein, chất nhầy và các thành phần dễ bị đông vón do nhiệt [2].

+ *Kết tủa do thay đổi pH:* Với các dịch chiết chứa hoạt chất có độ tan phụ thuộc pH (alcaloid, flavonoid, acid phenolic, acid/base hữu cơ,…), điều chỉnh pH của dịch chiết để thay đổi độ tan của hoạt chất, tạo điều kiện cho chúng kết tinh và/hoặc kết tủa, từ đó loại được tạp chất. Ví dụ, cao khô rễ bán chi liên được điều chế theo quy trình sau: Sắc rễ bán chi liên với nước, phối hợp dịch sắc, cô đặc đến dạng cao lỏng, điều chỉnh pH dịch cô đến 1-2 bằng dung dịch HCl 10%, duy trì nhiệt độ ở 80°C, để yên cho kết tủa và lọc lấy tủa. Hòa tủa vào đồng lượng nước và điều chỉnh pH đến 7 bằng dung dịch NaOH 40%, thêm đồng lượng ethanol, khuấy đều và lọc trong. Lại điều chỉnh pH dịch lọc đến pH 1-2 bằng acid hydrocloric, giữ nhiệt độ ở 60°C, để yên cho kết tủa và lọc lấy tủa. Rửa tủa bằng nước và hỗn hợp ethanol-nước các tỷ lệ khác nhau đến khi dịch rửa có pH 7, sấy khô trong chân không. Hàm lượng baicalin trong cao không dưới 85% [2].

+ *Kết tủa bằng nước (Water precipitation):* Cô dịch chiết (ví dụ: dịch chiết cồn) để hạ thấp độ cồn, việc này giúp kết tủa sáp, nhựa, chất béo và một số tạp chất ít tan trong nước (ví dụ: clorophyll). Có thể pha loãng bằng nước (hoặc nước acid nếu hoạt chất có tính base) và/hoặc thêm các tác nhân hấp phụ (bột talc,…) để kết tủa triệt để tạp chất. Phương pháp được ứng dụng trong sản xuất một số cao dược liệu như cao rễ tam thất (*Panax notoginseng*) [13], cao nhân trần cao (*Artemisia scoparia* hoặc *Artemisia capillaris*) [5], cao benladon (*Atropa belladonna*) [5].

+ *Kết tủa bằng cồn (Alcohol precipitation)*: Cô dịch chiết (ví dụ: dịch chiết nước) đến tỷ trọng thích hợp, để nguội, thêm vài phần cồn cao độ (ethanol, isopropanol), khuấy đều, để lắng chỗ mát, gạn, lọc. Cách này loại các tạp chất phân cực mạnh như đường, muối và các polyme sinh học, các chất cao phân tử như polysaccharid, lignan, polypeptid, protein, carbohydrat…[7],[14].

Trong các phương pháp kết tủa trên, kết tủa bằng cồn là phương pháp phổ biến nhất, nguyên nhân một phần do cao dược liệu được chiết xuất bằng nước là chủ yếu [7]. Cơ chế của phương pháp như sau: Khi thêm cồn (ethanol, isopropanol) vào dịch chiết đặc, độ tan của các tạp chất phân cực mạnh và các đại phân tử giảm nên sẽ kết tủa. Các nghiên cứu cho thấy, độ tan của đường giảm khi tăng nồng độ cồn và giảm nhiệt độ, do đó kết hợp điều chỉnh tỷ lệ cồn trong hỗn hợp và nhiệt độ để kết tủa tạp chất. Các polysaccharid có mức độ polyme hóa cao càng dễ bị kết tủa trong hỗn hợp cồn-nước. Bằng cách thay đổi nồng độ cồn sẽ giúp loại bỏ các polysaccharid có khối lượng phân tử (KLPT) khác nhau. Nhiều protein kết tủa trong hỗn hợp cồn-nước, sự kết tủa tăng khi tăng tỷ lệ cồn trong hỗn hợp. Ngược lại độ tan của các hoạt chất (acid phenolic, flavonoid, phenols, alcaloid, saponin,…) trong hỗn hợp cồn-nước tăng nên về lý thuyết sẽ không bị kết tủa [10]. Với tannin, để tăng hiệu quả loại tạp chất có thể dùng cồn-kiềm để tăng độ phân cực và giảm độ tan của tannin trong hỗn hợp cồn-nước [15].

Một trong những nhược điểm của phương pháp này liên quan đến tính chọn lọc kết tủa, sự mất hoạt chất trong quá trình tinh chế có thể xảy ra theo 3 cơ chế sau: *(1) Mất do bao gói:* Do quá trình trộn 2 pha (pha dịch chiết đặc và pha cồn) không hoàn toàn dẫn tới sự hình thành các kết tủa lớn cục bộ, hoạt chất bị bao gói trong các kết tủa, cản trở hòa tan vào dung môi. Hiện tượng mất hoạt chất do bao gói cũng làm tăng hình thành các kết tủa, do đó quá trình tinh chế tạo nhiều chất rắn. Quá trình trộn không hoàn toàn do sự khác nhau về tỷ trọng của các pha, nếu dịch chiết càng nhớt sẽ tạo càng nhiều tủa khi thêm cồn cao độ. Các dịch đặc chứa tỷ lệ chất tan cao dễ mất hoạt chất theo cơ chế này. Tỷ lệ mất hoạt chất theo cơ chế này phụ thuộc vào: tính chất của dịch

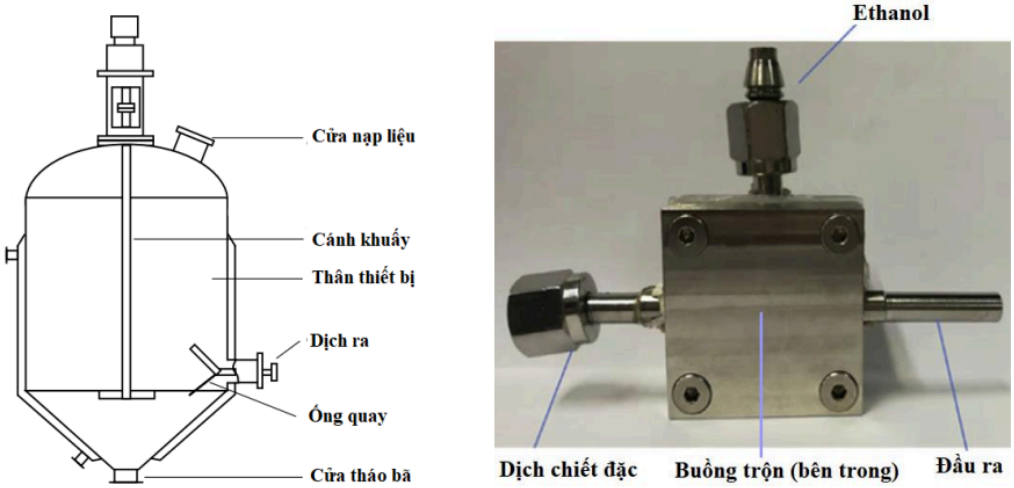
chiết đặc, thiết bị và điều kiện tinh chế. Tỷ lệ mất hoạt chất có thể giảm khi tăng thời gian lắng để tạo điều kiện cho hoạt chất hòa tan trở lại vào dung môi. *(2) Mất do kết tủa*: Hoạt chất bị kết tủa do giảm độ tan trong điều kiện tinh chế như: thay đổi dung môi, hạ nhiệt độ, thay đổi pH. Ví dụ các hoạt chất nhóm acid phenolic có độ tan phụ thuộc pH: trong môi trường pH cao, các hoạt chất sẽ tồn tại chủ yếu ở dạng muối phenolat kém tan trong hỗn hợp cồn-nước hơn so với trong nước, làm giảm độ tan và có thể bị kết tủa cùng tạp chất. *(3) Mất do phân hủy:* Cơ chế này xảy ra khi một số hoạt chất kém ổn định và dễ bị phân hủy (thủy phân, oxy hóa, khử hóa, polyme hóa) một phần trong quá trình tinh chế. So sánh tổng lượng hoạt chất trước và sau tinh chế có thể phát hiện được sự mất hoạt chất theo cơ chế phân hủy. Với hoạt chất tan nhiều trong hỗn hợp cồn-nước thì sự mất hoạt chất có thể xảy ra theo cơ chế bao gói (nếu có hoạt chất trong kết tủa). Với hoạt chất có độ tan trong hỗn hợp cồn-nước không quá lớn sẽ khó phân biệt hai cơ chế bao gói và kết tủa [10].

Các thông số quy trình trọng yếu gồm có: nồng độ cồn trong hỗn hợp, tỷ trọng dịch chiết đặc, nồng độ và lượng cồn sử dụng, tốc độ và cơ chế phối hợp 2 pha, nhiệt độ và thời gian kết tủa [10],[16],[17]. Việc cô đặc dịch chiết trước khi tinh chế giúp tiết kiệm cồn và tăng hiệu suất kết tủa tạp chất. Quá trình tinh chế có thể tiến hành trong các thiết bị có khuấy trộn hoặc các thiết bị trộn vi lưu (micromixer) (**Hình 2**) Với thiết bị có khuấy trộn, cồn cao độ được bơm vào thùng (tank) chứa dịch chiết đặc, hỗn hợp được khuấy trộn (bằng cánh khuấy hoặc sục khí trơ) để tạo sự đồng nhất và hạn chế sự mất hoạt chất do bao gói [10]. Với các micromixer, pha cồn được phân tán thành các giọt nhỏ qua một màng mỏng vào pha dịch chiết đặc, cơ chế này giúp quá trình trộn hiệu quả hơn và giảm sự mất hoạt chất do bao gói [18].

Kết tủa bằng cồn là phương pháp tinh chế truyền thống, phổ biến nhất hiện nay để tinh chế các dịch chiết dược liệu chứa nhiều tạp chất thân nước (ví dụ: dịch chiết nước bằng phương pháp sắc) [7]. Trong CP 2015 có 274/1493 (18,4%) chuyên luận các sản phẩm chiết từ dược liệu sử dụng phương pháp kết tủa bằng cồn trong giai đoạn tinh chế [5]. Đây có thể là bước tinh chế sơ bộ hoặc duy nhất trong quy trình tinh chế dịch chiết, đồng thời cũng có thể áp dụng nhiều lần để tăng hiệu quả loại tạp chất [9],[19]. Hiệu quả của bước tinh chế này có ảnh hưởng lớn tới các bước xử lý tiếp theo trong quy trình sản xuất và chất lượng sản phẩm chiết. Phương pháp được áp dụng với nhiều loại chế phẩm từ dược liệu (uống, dùng ngoài, tiêm, nhỏ mắt,…).

Ưu điểm: Dễ thực hiện, dễ nâng quy mô, dung môi an toàn. Khả năng loại tạp lớn nên giúp làm trong dịch chiết tốt [7] và giảm liều hiệu quả, nên thuận lợi để ứng dụng cao dược liệu trong bào chế các dạng thuốc.

Hạn chế: Tính chọn lọc kết tủa không hoàn toàn nên có nguy cơ mất hoạt chất (chủ yếu mất hoạt chất do cơ chế bao gói trong kết tủa); đồng thời làm kết tủa nhiều polyme có lợi trong dịch chiết, đó là các chất ổn định hệ keo tự nhiên của dịch chiết, nên các chế phẩm lỏng sản xuất từ dịch chiết dược liệu có thể bị đục khi bảo quản; thời gian kết tủa tương đối lâu (so với một số phương pháp khác như phương pháp kết bông), tốn năng lượng để làm lạnh và thu hồi cồn, lượng cồn sử dụng tương đối lớn, khó khăn trong loại tủa sau tinh chế [7],[10].



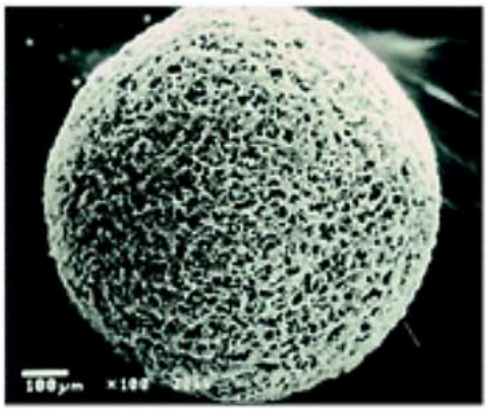
Hình 2. Thiết bị tinh chế bằng phương pháp kết tủa sử dụng cánh khuấy (trái) và micromixer (phải) [10],[18]

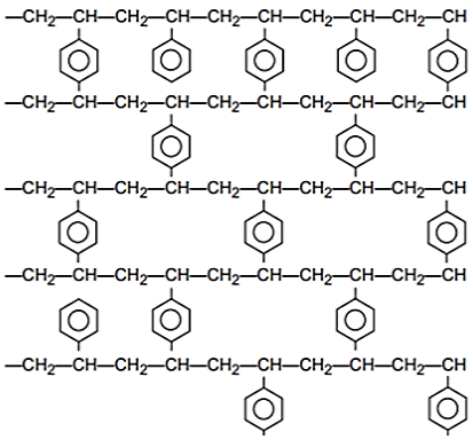
3.2. Phương pháp hấp phụ

Hấp phụ (adsorption) là sự tập trung của một hoặc một nhóm chất lên bề mặt các vật liệu có cấu trúc xốp. Cơ chế hấp phụ có thể là cơ chế vật lý (physisorption), hóa học (chemisorption) hoặc chuyển dời điện tử (ionosorption). Hấp phụ có thể xảy ra giữa các pha rắn-rắn, rắn-lỏng và rắn-khí [20]. Trong đó, sự hấp phụ của các chất tan trong dung dịch lên bề mặt chất mang rắn (chất hấp phụ) đóng vai trò quan trọng trong tinh chế dịch chiết dược liệu. Quá trình này được ứng dụng trong loại bỏ tạp chất (ví dụ dùng than hoạt để loại tạp màu trong dịch chiết tam thất (*Panax notoginseng*) [13] hoặc nhựa có cấu trúc lỗ xốp lớn (macroporous resin, nhựa macroporous) để loại protein và tạp màu trong dịch chiết nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) [21]) hay thu hồi chọn lọc hoạt chất từ dịch chiết (ví dụ dùng nhựa macroporous tổng hợp để thu hồi saponin trong dịch chiết rễ tam thất [22]).

Tất cả các chất rắn khi được phân chia nhỏ đều có khả năng hấp phụ ít nhiều các chất khác trên bề mặt của nó và ngược lại tất cả các chất đều có thể bị hấp phụ từ dung dịch ở các mức độ khác nhau. Hiện tượng hấp phụ chọn lọc là nguyên lý cơ bản trong tinh chế dịch chiết dược liệu. Theo Liên minh Quốc tế về Hóa học thuần túy và Hóa học ứng dụng (IUPAC), các chất hấp phụ được phân thành 3 nhóm theo kích thước lỗ xốp (mao quản), gồm: < 2 nm (microporous) như zeolit, 2-50 nm (mesoporous) như các vật liệu từ silicat/aluminosilicat và > 50 nm (macroporous) như gốm, các gel xốp và thủy tinh xốp. Tuy nhiên, một số tài liệu xem nhựa hấp phụ macroporous tổng hợp có kích thước lỗ xốp lớn hơn 50 Å [23]. Để ứng dụng trong tinh chế dịch chiết dược liệu, các chất hấp phụ cần có diện tích bề mặt riêng lớn, số lượng và đường kính lỗ xốp đủ lớn để các phân tử chất bị hấp phụ có thể tiếp xúc được bề mặt, nhưng cần đủ nhỏ để tạo tính chọn lọc cao, có thể hoàn nguyên dễ dàng bằng các dung môi an toàn, đủ bền với các va chạm cơ học và dễ vận hành.

Một số chất hấp phụ thông thường gồm than hoạt tính, zeolite, *silica gel* và nhựa tổng hợp [20],[24]. Trong đó, nhựa tổng hợp có cấu trúc lỗ xốp lớn (nhựa macroporous tổng hợp, loại không ion hóa) ngày càng được ứng dụng hiệu quả trong sản xuất cao dược liệu do những ưu điểm nổi bật. Đó là các hạt polyme hình cầu, đặc trưng bởi số lượng lớn các lỗ xốp làm cho hạt nhựa có diện tích bề mặt tiếp xúc lớn và có khả năng hấp phụ các phân tử nhỏ. Các thông số đặc trưng cho khả năng hấp phụ của nhựa macroporous gồm: diện tích bề mặt, kích thước hạt, đường kính lỗ xốp và độ phân cực bề mặt. Diện tích bề mặt bên trong của nhựa khô thường từ 100 đến 1000 m^2/g, đường kính lỗ xốp dao động từ 100 đến 300 Å, sự phân cực của nhựa có thể khác nhau tùy loại monome được sử dụng trong quá trình tổng hợp hoặc cách xử lý hóa học bổ sung sau trùng hợp (**Hình 3**, **Bảng 1**) [23],[25]. Tỷ lệ giữa đường kính lỗ xốp với đường kính của phân tử nằm trong khoảng 2-6 là tối ưu. Nếu lỗ xốp quá nhỏ, phân tử bị hấp phụ rất khó khuếch tán vào trong lỗ xốp. Mặt khác, nếu lỗ xốp quá lớn, phân tử chất tan sau khi bị hấp phụ sẽ có xu hướng thoát khỏi lỗ xốp một cách dễ dàng [23]. Do vậy, mỗi loại nhựa macroporous được sản xuất phù hợp với các nhóm hoạt chất khác nhau. Tương tác giữa nhựa macroporous và chất bị hấp phụ có thể xảy ra theo các cơ chế như lực Van der Waals, liên kết hydro, tương tác π-π, lực tĩnh điện [23],[25].



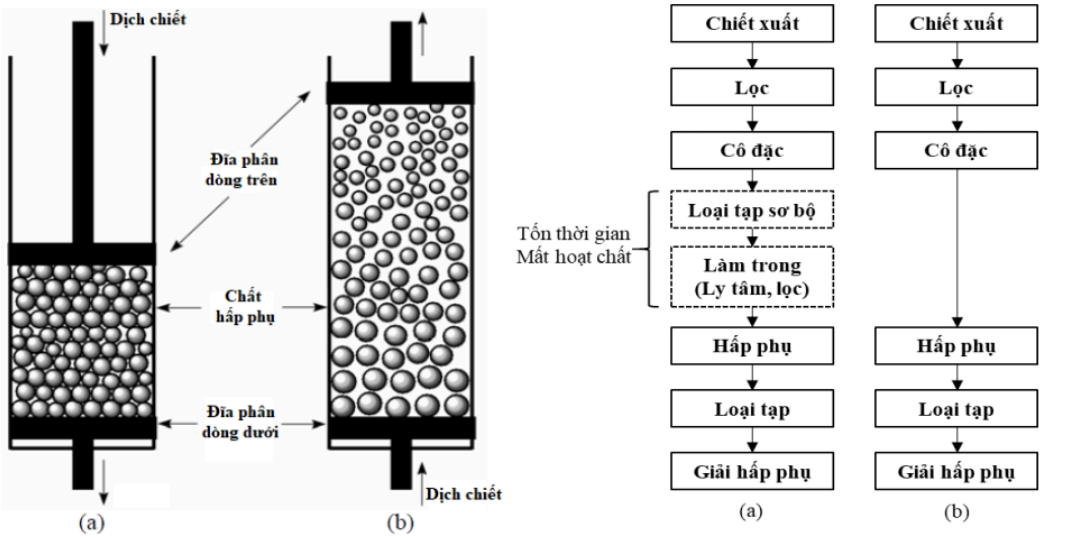


Hình 3. Hình ảnh kính hiển vi điện tử quét hạt nhựa hấp phụ macroporous (thước 100 µm) (trái) [23] và một phần mạng lưới polyme polystyren liên kết chéo trong cấu trúc nhựa macroporous (phải)

Bảng 1. Phân loại nhựa macroporous

Tính phân cực	Cấu trúc	Kích thước hạt (mm)	Diên tích bề mặt (m^2/g)	Ví dụ
Không phân cực	Styren	0,3 - 1,2	500 - 600	D1400, D101
Phân cực yếu	Polystyren	0,3 - 1,0	500 - 650	HP-20
Phân cực trung bình	Polystyren, Styren-divinyl benzen	0,3 - 1,2	550	XAD-8
Phân cực mạnh	Polystyren, Styren, Sulfonic	0,3 - 1,2	100 - 220	DA201

Quá trình hấp phụ có thể tiến hành trong các tank có khuấy trộn (kỹ thuật mẻ, batch process) hoặc trên cột (kỹ thuật cột, column process) [20],[24]. Khi triển khai trên cột, có thể chia thành kỹ thuật cột tĩnh (fixed bed process) hoặc kỹ thuật cột động (moving bed process) tùy thuộc vào chiều di chuyển của dịch chiết và đặc tính giãn nở của chất hấp phụ trong cột. Trong đó, kỹ thuật cột tĩnh được sử dụng phổ biến nhất. Một số biến thể của kỹ thuật cột động là kỹ thuật cột giãn nở (expanded bed adsorption), kỹ thuật cột bán tầng sôi (semifluidized bed), kỹ thuật cột phân tán (suspended bed) [20],[26]. So sánh 3 kỹ thuật hấp phụ được trình bày ở **Hình 4** và **Bảng 2**. Ngoài ra, các cải tiến mới trong kỹ thuật cột tĩnh cũng được nghiên cứu và cho thấy hiệu quả để tinh chế cao dược liệu với nhiều thành phần phức tạp [22].



Hình 4. So sánh kỹ thuật cột tĩnh (a) và kỹ thuật cột giãn nở (b) [34]

Các thông số quy trình trọng yếu trong phương pháp hấp phụ gồm có: nồng độ, pH và thể tích dịch chiết, cơ chế và tốc độ khuấy trộn, tốc độ nạp dịch, điểm dừng hấp phụ, loại và thể tích dung môi loại tạp, loại và thể tích dung môi giải hấp phụ, tốc độ rửa giải.

Ưu điểm của phương pháp hấp phụ sử dụng nhựa macroporous trong tinh chế dịch chiết gồm: thuận tiện, vận hành đơn giản, hầu hết đều sử dụng các dung môi xanh như nước và ethanol, ít tồn dư hóa chất độc hại trong sản phẩm, năng suất, chi phí thấp do lượng dung môi sử dụng ít và nhựa có thể tái sử dụng. Với các dịch chiết nước loãng, đây là phương pháp hiệu quả để loại tạp chất và cô đặc dịch chiết, giúp tiết kiệm chi phí sản xuất. Phương pháp ứng dụng cho cả hoạt chất thân nước và thân dầu thuộc nhiều nhóm như flavonoid [27], polyphenol, glycosid [23], saponin [28], alcaloid [29], terpenoid [30], coumarin [31]. Hầu hết các quy trình tinh chế cho hiệu suất thu hồi hoạt chất cao (> 70%) và hàm lượng hoạt chất dao động trong khoảng 10-90% tùy thuộc vào mức độ phức tạp của các thành phần trong dịch chiết [23]. Rất nhiều cao dược liệu được tinh chế bằng phương pháp hấp phụ với nhựa macroporous như cao lá bắc sơn tra (*Crataeus pinnatifida*) [5], cao lá bạch quả (*Ginkgo biloba* L.) [5],[26], cao lá chè xanh (*Camellia sinensis*) [32], cao rễ đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) [33]. Ngoài ra, nhiều nhóm hoạt chất cũng được tinh chế bằng phương pháp này như ginsenosid toàn phần rễ nhân sâm, ginsenosid toàn phần lá và cuống lá nhân sâm, saponin toàn phần rễ tam thất, nhóm saponin triol rễ tam thất [5],[22].

Bảng 2. So sánh các kỹ thuật hấp phụ: kỹ thuật mẻ, kỹ thuật cột tĩnh và kỹ thuật cột giãn nở

Kỹ thuật	Kỹ thuật mẻ	Kỹ thuật cột tĩnh	Kỹ thuật cột giãn nở
Nguyên tắc	Quá trình gồm 3 bước: hấp phụ (sử dụng dịch chiết nước, cồn thấp độ), loại tạp (sử dụng nước, cồn thấp độ), giải hấp phụ (sử dụng cồn cao độ).		
	• Dịch chiết tiếp xúc với chất hấp phụ đã xử lý trong thiết bị có khuấy trộn. • Cân bằng hấp phụ xảy ra chậm. • Vận hành theo chế độ gián đoạn hoặc liên tục.	• Dịch chiết chảy qua cột từ trên xuống, chất hấp phụ không chuyển động trong cột. • Cân bằng hấp phụ được thiết lập khi nồng độ hoạt chất trong dịch sau cột bằng nồng độ hoạt chất trong dịch chiết nạp cột. • Điểm dừng hấp phụ thường trước thời điểm cân bằng hấp phụ (để hạn chế tỷ lệ hoạt chất không hấp phụ).	• Dịch chiết chảy qua cột từ dưới lên. • Do đặc tính giãn nở, tỷ trọng và kích thước khác nhau, chất hấp phụ sẽ phân bố lại trong cột theo gradient tỷ trọng, do đó làm tăng khoảng cách giữa các hạt.
Ưu điểm	• Đơn giản, dễ thực hiện.	• Tăng hiệu suất hấp phụ (so với kỹ thuật mẻ). • Dễ thực hiện chế độ rửa giải gradient. • Dễ tích hợp với giai đoạn chiết xuất tạo thành quá trình chiết và tinh chế đồng thời.	
		• Áp dụng cho nhiều loại chất hấp phụ khác nhau. • Trang thiết bị đơn giản (so với kỹ thuật cột động).	• Giảm trở lực dòng chảy, tăng được tốc độ dòng, tránh nguy cơ tắc cột, tăng hiệu suất hấp phụ. • Không cần làm trong dịch chiết trước khi hấp phụ nên tiết kiệm thời gian, chi phí, giảm mất hoạt chất. • Vùng tiếp xúc và sự chuyển khối giữa hoạt chất và chất hấp phụ được tăng cường, tăng hiệu năng khai thác cột. • Dòng dịch chiết chuyển động giữa các hạt hấp phụ trong cột được tăng cường nên giúp loại bỏ nhiệt sinh ra trong quá trình hấp phụ.
Nhược điểm	• Hiệu suất hấp phụ không cao. • Thường tiến hành hấp phụ nhiều lần để tăng dung lượng hấp phụ hoạt chất nên tốn thời gian. • Khó thực hiện chế độ rửa giải gradient.	• Trở lực dòng chảy lớn, khó tăng tốc độ dòng, nguy cơ tắc cột với chất hấp phụ kích thước nhỏ hoặc dịch chiết không trong. • Thường cần có bước làm trong dịch chiết trước hấp phụ nên tốn thời gian, chi phí, tăng nguy cơ mất hoạt chất. • Quá trình chuyển khối của hoạt chất bị giới hạn tại một vùng trong cột, giảm hiệu năng khai thác cột. • Khó loại bỏ nhiệt sinh ra trong các quá trình hấp phụ tỏa nhiệt, giảm hiệu suất hấp phụ.	• Thiết bị, thao tác vận hành phức tạp, tăng chi phí. • Chỉ phù hợp với các chất hấp phụ có đặc tính phù hợp (độ giãn nở, tỷ trọng, kích thước và phân bố kích thước hạt…). • Khó khăn khi nâng quy mô (thiết kế đĩa phân dòng, chi phí chất hấp phụ…).

3.3. Phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng

Chiết phân bố lỏng-lỏng là phương pháp tinh chế dựa trên độ tan và sự phân bố khác nhau của hoạt chất và tạp chất giữa hai pha lỏng không đồng tan. Trong hầu hết các trường hợp, để tăng bề mặt chuyển khối, hai pha lỏng được khuấy trộn kỹ với nhau, hoặc một pha được phân tán thành giọt nhỏ trong pha kia, sau đó để yên cho hai pha phân lớp. Thông thường trong kỹ thuật chiết phân bố cổ điển, một pha là pha nước chứa hỗn hợp các thành phần cần tinh chế, pha kia là dung môi hữu cơ (không trộn lẫn với nước) có khả năng hòa tan tốt và chọn lọc một số thành phần trong hỗn hợp. Hai pha cần có tỷ trọng khác nhau và dễ dàng phân lớp sau khi trộn kỹ vào nhau.

Cao lá bạch quả giàu flavonoid (chứa 5 - 7% ginkgolid và bilobalid (terpen trilacton), 22 - 24% flavonoid và ít hơn 5 ppm acid ginkgolic) được đưa vào dược điển của nhiều nước và được sản xuất bởi nhiều công ty, trong đó quy trình phổ biến chung là: chiết xuất lá bạch quả (*Ginkgo biloba* L.) bằng dung môi hữu cơ (aceton hoặc ethanol) sau đó tinh chế dịch chiết bằng phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng qua nhiều giai đoạn: lần 1 bằng hỗn hợp butanol-aceton, lần 2 bằng butanol và lần 3 bằng heptan (ít nhất 3 lần) [35]. Gong X. và cs. (2011) so sánh 2 phương pháp tinh chế trong quy trình sản xuất thuốc tiêm đan sâm, một dạng bào chế yêu cầu tính an toàn rất cao. Dịch chiết nước rễ đan sâm (chiết bằng phương pháp sắc) được cô đặc và tinh chế lần 1 bằng phương pháp kết tủa bằng ethanol (độ cồn 75%), dịch tinh chế được cô đặc (độ tinh khiết 17,6%) và tinh chế lần 2 bằng 2 phương pháp: kết tủa bằng ethanol (độ cồn trên 80%) hoặc chiết phân bố lỏng lỏng với 1-butanol. Kết quả cho thấy, cả 2 phương pháp tinh chế đều cho hiệu suất thu hồi hoạt chất acid phenolic và hiệu suất loại protein cao. Tuy nhiên, phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng tỏ ra hiệu quả hơn trong việc loại tạp chất saccharid so

với phương pháp kết tủa bằng ethanol. Do đó, độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế bằng phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng (48,3-77,2%) cao hơn so với độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế bằng phương pháp kết tủa bằng ethanol (27,5-29,8%). Ngoài ra, phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng vận hành theo chế độ liên tục, so với chế độ gián đoạn của phương pháp kết tủa bằng ethanol [9].

Mặc dù được ứng dụng nhiều trong thời gian trước nhưng cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, phương pháp chiết phân bố cổ điển sử dụng các dung môi hữu cơ (butanol, heptan, ethyl acetat, ether, cloroform, dicloromethan, *n*-hexan) bộc lộ nhiều hạn chế như: lượng dung môi sử dụng lớn, tốn thời gian, đòi hỏi thiết bị phức tạp và khó khăn khi nâng quy mô sản xuất. Hơn nữa, các vấn đề liên quan đến môi trường và tồn dư dung môi độc hại trong sản phẩm là một trong những thách thức khi ứng dụng trong công nghiệp [35]. Để khắc phục vấn đề này, phương pháp chiết phân bố sử dụng hai pha thân nước (*aqueous two phase extraction*) được nghiên cứu và cho thấy hiệu quả cao trong nhiều trường hợp. Phương pháp này dựa trên sự không tương hợp giữa hai pha lỏng thân nước để tạo ra sự phân tách pha. Một số hệ hai pha hay sử dụng là polyme/muối (polyethylen glycol (PEG)/kali phosphat, PEG và amoni sulphat), polyme/polyme (PEG/dextran) và alcol phân tử lượng thấp/muối (ethanol, 1-propanol, 2-propanol/amoni sulphat), ester/muối (ethyl lactat/trinatri citrat, dinatri tartrat và dinatri succinat). Hệ 2 pha thân nước sử dụng các polyme có nhược điểm là tốc độ chuyển khối và phân tách pha khá chậm do độ nhớt lớn và không bay hơi. Hệ này được ứng dụng nhiều trong công nghệ sinh học để làm tinh sạch các phân tử protein. Trong chiết xuất dược liệu, hệ 2 pha alcol/dung dịch muối được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi với các ưu điểm như khả năng phân tách nhanh và ổn định nhiệt động học, nhiều hệ có tính chọn lọc cao với nhiều lớp hoạt chất, hiệu suất thu hồi hoạt chất cao và dễ dàng tái sử dụng. Cơ chế phân tách pha có thể là sự cạnh tranh hòa tan và sự khác biệt về tỷ trọng giữa hai pha thân nước khi có mặt muối [2],[36].

Các điều kiện tối ưu cho một quá trình tinh chế bằng các hệ này được xác định bằng các yếu tố như bản chất các thành phần trong hệ (polyme, muối, alcol…), bản chất phân tử mục tiêu (độ phân cực, tính tan, tính mang điện, pKa…), nồng độ các thành phần, tỷ lệ các pha, các yếu tố kỹ thuật (pH, nhiệt độ, khuấy trộn…). Các pha có thể được phân tách trong một thùng lắng, nhưng để phân tách nhanh và hiệu quả hơn có thể sử dụng phối hợp với phương pháp ly tâm. Đặc biệt, kỹ thuật chiết phân bố sử dụng hệ hai pha lỏng thân nước có thể tích hợp với nhiều phương pháp chiết xuất khác nhau như chiết siêu âm, chiết vi sóng để tạo thành quá trình chiết và tinh chế đồng thời, giúp tiết kiệm dung môi, rút ngắn thời gian sản xuất và giảm chi phí [36],[37].

3.4. Phương pháp kết bông (flocculation)

Dịch chiết dược liệu chứa nhiều tạp chất (tannin, pectin, protein,…) tồn tại dưới dạng keo có kích thước rất nhỏ. Theo thời gian, các tạp chất này có thể liên kết với nhau hoặc với các thành phần khác trong dịch chiết (alcaloid, polysaccharid…) tạo thành các kết tủa, làm dịch chiết đục và mất ổn định [38]. Kết bông là quá trình tách các tiểu phân tạp chất (dạng keo) ra khỏi dịch chiết dưới dạng bông (flocs) nhờ các tác nhân tạo bông (flocculant) [39],[40]. Đây là quá trình phân tách vật lý. Tác nhân tạo bông thường là các polyme tổng hợp (polyacrylamid…) hoặc polyme sinh học (chitosan và dẫn chất…). Ưu điểm của tác nhân chitosan là sẵn có, an toàn. Tuy nhiên, chitosan hoạt động trong vùng pH khá hẹp do độ tan trong nước phụ thuộc pH (tủa khi pH > 6,5), do đó hiện nay người ta điều chế các dẫn chất dễ tan trong nước của chitosan (chitosan hydroclorid, N-hydroxypropyl trimethyl ammonium chlorid chitosan…) [39],[40],[41].

Cơ chế tạo bông có thể bao gồm các cơ chế sau: (1) Trung hòa điện tích: tác nhân tạo bông mang điện tích trái dấu với tạp chất nên có tác dụng trung hòa điện tích, giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các tiểu phân tạp chất, giúp dễ kết bông; (2) Tạo cầu nối polyme: tác nhân tạo bông (polyme) đóng vai trò là cầu nối để kết bông tạp chất thông qua liên kết hydro, tương tác tĩnh điện hoặc tương tác kỵ nước; (3) Hấp phụ: tạp chất hấp phụ lên polyme đóng vai trò là tác nhân tạo bông [38],[39]. Quá trình kết bông tối ưu khi nồng độ tác nhân tạo bông phù hợp để trung hòa điện tích của tiểu phân keo hoặc thế Zeta của các tiểu phân tạp chất trong dịch chiết ~ 0. Cơ chế tạo bông phụ thuộc vào điều kiện tiến hành: nồng độ tác nhân tạo kết bông, nồng độ tạp chất, nhiệt độ, pH, điều kiện thủy động do các điều kiện này ảnh hưởng đến sự tái sắp xếp của chuỗi polyme, sự va chạm của các tiểu phân keo, mức độ proton hóa của các nhóm chức ($-NH_2$, -OH…) trên polyme và tiểu phân tạp chất.

Nhìn chung, quá trình kết bông gồm các bước chính: Bước phối hợp nhanh tác nhân tạo bông vào dịch chiết để phá vỡ sự ổn định của hệ keo và làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các tiểu phân tạp chất, hình thành các bông sơ cấp dưới điều kiện khuấy trộn nhanh. Bước tiếp theo là kết tập các tiểu phân keo bị mất ổn định để tạo thành các bông lớn và được loại khỏi dịch chiết bằng cách lắng, lọc, ly tâm. Đây là quá trình vật lý nên chế độ khuấy trộn 2 pha đóng vai trò rất quan trọng: lúc đầu nhanh, lúc sau chậm [7]. Các thông số quy trình trọng yếu gồm: loại và nồng độ tác nhân tạo bông, pH, nhiệt độ, điều kiện thủy động, thời gian. Các thuộc tính chất lượng trọng yếu của quy trình: hiệu suất loại tạp chất, hiệu suất thu hồi hoạt chất,

độ đục của dịch chiết, kích thước và phân bố kích thước của bông, độ bền của bông, khả năng tái tạo bông, khả năng loại bông khỏi dịch chiết [7],[38].

Phương pháp kết bông có ưu điểm: quy trình đơn giản, tốn ít thời gian so với phương pháp kết tủa bằng cồn, khả năng làm trong dịch chiết cao, phổ loại tạp rộng (tannin, protein, pectin…), chi phí thấp và ít mất hoạt chất. Một số ít hạn chế của phương pháp là cần lựa chọn tác nhân tạo bông phù hợp và khó khăn trong loại bông khỏi dịch chiết. Sun và cs. (2013) so sánh phương pháp kết bông (sử dụng chitosan hydroclorid làm tác nhân tạo bông) và phương pháp kết tủa bằng ethanol trong tinh chế dịch chiết bài thuốc Xiao'er Kechuanling cho thấy, phương pháp kết bông cho hiệu suất thu hồi hoạt chất acid chlorogenic và tỷ lệ loại tạp chất tannin cao hơn so với phương pháp kết tủa bằng ethanol. Tuy nhiên, phương pháp kết tủa bằng ethanol cho tỷ lệ loại protein cao hơn, nên khả năng làm trong dịch chiết tốt hơn so với phương pháp kết bông [7].

3.5. Phương pháp tách màng (membrane separation)

Cơ chế của phương pháp tách màng là quá trình phân tách vật lý nhờ việc sử dụng các màng lọc có kích thước lỗ lọc phù hợp để loại bỏ tạp chất và làm giàu hoạt chất dựa vào sự khác nhau về kích thước và trọng lượng phân tử (TLPT) giữa hoạt chất và tạp chất trong dịch chiết (thường các hoạt chất có TLPT < 1000 Da, các tạp chất như các đại phân tử: tinh bột, polysaccharid, protein, nhựa có TLPT > 50 000 Da) [42],[43]. Phần đoạn giàu hoạt chất có thể là phần qua màng hoặc giữ lại trên màng. Quá trình tinh chế thường phối hợp nhiều loại màng lọc khác nhau để có hiệu quả tách tốt: màng vi lọc (MF) có kích thước lỗ lọc khoảng 0,2 µm, màng siêu lọc (UF) từ vài chục đến vài nghìn KDa tương ứng với kích thước lỗ lọc từ vài chục nm - trăm nm và màng lọc nano (NF) cỡ vài KDa tương ứng với với kích thước lỗ lọc từ vài nm đến vài chục nm [42]. UF và NF có giá trị trọng lượng phân tử cut-off (MWCO) thể hiện cho khả năng tách loại chất tan của nó: ít nhất 95% các phân tử có TLPT tối thiểu bằng MWCO được giữ lại trên màng. MF có khả năng giữ lại các đại phân tử (tinh bột, pectin, protein, tannin…), vi khuẩn. UF có thể giúp loại vi sinh vật, giữ lại virus, sợi nấm, chất gây sốt. NF cho đi qua các thành phần như muối vô cơ, acid hữu cơ, một số phân tử nhỏ, ion kim loại, nước [44].

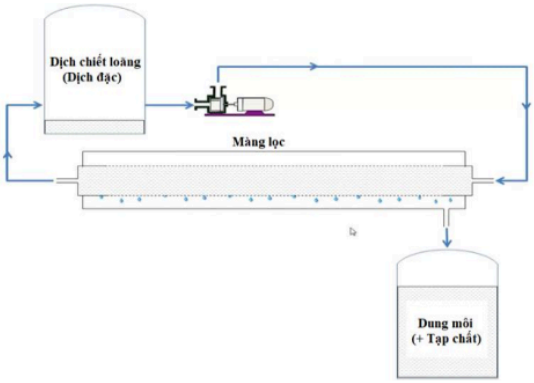
Vật liệu tạo màng có thể là hữu cơ (polyme tự nhiên, tổng hợp) như cellulose (dùng trong MF, UF), polypropylen (dùng trong MF), polysulfon hay polyacrylonitril (dùng trong UF, NF) hoặc vô cơ như kim loại, sứ (ZrO_2, Al_2O_3). Vật liệu vô cơ có nhiều ưu điểm nổi bật như: bền với nhiệt hơn màng hữu cơ, có thể tiệt khuẩn trực tiếp bằng hơi nước trong sản xuất thuốc từ dược liệu; tính kháng hóa học cao, dễ dàng vệ sinh bằng các tác nhân hóa học nên duy trì tốc độ lọc tốt, bền hơn màng hữu cơ; kích thước lỗ lọc đều hơn (± 20% đường kính trung bình) nên dễ dàng phân tách các thành phần khác nhau trong dịch chiết [43],[44]. Thường màng lọc được sắp xếp thành các module để làm tăng diện tích trên một đơn vị thể tích màng và tạo thuận lợi cho quá trình lắp đặt, vận hành, vệ sinh. Các module thường là dạng khung bản, dạng cuộn, dạng ống và dạng mao quản.

Hiệu quả của phương pháp tách màng phụ thuộc vào các yếu tố thuộc về màng lọc (bản chất màng, kích thước lỗ lọc, bề dày lớp màng, diện tích bề mặt màng), dịch chiết (tỷ trọng, độ nhớt, pH, thành phần tạp chất, hoạt chất) và các điều kiện kỹ thuật (nhiệt độ, áp suất, tốc độ bơm dịch, chế độ lọc màng). Các thuộc tính chất lượng trọng yếu của quy trình tách màng gồm: tốc độ lọc (Flux, $L.h^{-1}.m^{-2}$), hiệu suất thu hồi hoạt chất, hiệu suất loại tạp chất, chất lượng sản phẩm (hàm lượng hoạt chất, pH, độ trong, độ nhớt, độ dẫn điện) [43],[44].

Một trong những khó khăn lớn nhất trong phương pháp tách màng là việc tắc màng, làm giảm tốc độ lọc trong quá trình tinh chế. Đặc biệt với dịch chiết dược liệu chứa nhiều thành phần phức tạp và có độ nhớt cao. Cơ chế của hiện tượng này có thể là do tạp chất hấp phụ, lắng đọng trên bề mặt ngoài của màng và trong lỗ xốp của màng và/hoặc tăng gradient nồng độ chất tan giữa 2 bên màng theo thời gian nên làm giảm tốc độ thấm trong màng [43]. Một số nghiên cứu cho thấy màng lọc thân nước cho tốc độ lọc lớn hơn màng thân dầu [45]. Ngoài ra, có thể cải thiện hiện tượng tắc màng bằng các yếu tố như siêu âm [43], xử lý plasma hoặc cải biến hóa học vật liệu tạo màng [46],[47],[48].

Phương pháp tách màng là phương pháp tinh chế hiện đại, có nhiều ưu điểm vượt trội so với các phương pháp truyền thống như: vừa có khả năng loại dung môi (cô đặc) và loại bỏ tạp chất; điều kiện làm việc tương đối nhẹ nhàng về nhiệt độ, áp suất và áp lực chia cắt, do đó hoạt chất không bị biến đổi trong quá trình tinh chế, điều này giúp bảo vệ được hoạt tính và tính chất vốn có của dịch chiết (quan trọng khi sản xuất các dạng thuốc lỏng từ dược liệu); an toàn, không dùng dung môi, tác nhân độc hại. So với phương pháp kết tủa bằng cồn, phương pháp tách màng thực hiện tinh chế trực tiếp dịch chiết mà không cần loại dung môi và làm lạnh nên giúp giảm thời gian sản xuất, không sử dụng cồn nên giảm tiêu tốn năng lượng loại cồn và ít mất hoạt chất. Đây là một phương pháp tiệt khuẩn không dùng nhiệt nên áp dụng được với các chế phẩm vô khuẩn từ dược liệu như thuốc tiêm. Ngoài ra, phương pháp có thể tích hợp với giai đoạn chiết xuất để tạo thành quá trình chiết và tinh chế đồng thời [43],[49]. Tuy nhiên, chi phí khá lớn về màng lọc, lắp đặt, vận hành và tái sử dụng màng cũng như vấn đề tắc màng là những hạn chế cơ bản của phương pháp tách màng trong tinh chế

dịch chiết dược liệu. Cần có những nghiên cứu cải tiến vật liệu tạo màng, các điều kiện vận hành và phương pháp xử lý tái sử dụng màng để tăng hiệu quả và tiết kiệm chi phí.



Hình 5. Minh họa một quá trình tinh chế dịch chiết bằng phương pháp tách màng theo chế độ lọc tiếp tuyến

Một số nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp tách màng trong tinh chế các dịch chiết dược liệu như Qiao và cs. (2007) sử dụng màng lọc nano polyacrylonitril để tinh chế dịch chiết rễ đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) [45], Pi và cs. (2011) sử dụng MF và NF để tinh chế dịch chiết nước ma hoàng (*Ephedra sinica*) [49], Li và cs. (2012) sử dụng màng vi lọc sứ để tinh chế dịch chiết bài thuốc TongBi (gồm các dược liệu *Radix Aconiti kusnezoffii praeparata*, *Angelica sinensis*, *Syzygium aromaticum*, *Rhizoma Alpiniae officinarum* và *Cortex Acanthopanacis gracilistyli*) [43], Yang và cs. (2020) sử dụng kết hợp MF, UF và NF để tinh chế và cô đặc nhóm hoạt chất flavon glycosid toàn phần từ kim tiền thảo (*Desmodium styracifolium)* [42].

3.6. Phương pháp trao đổi ion

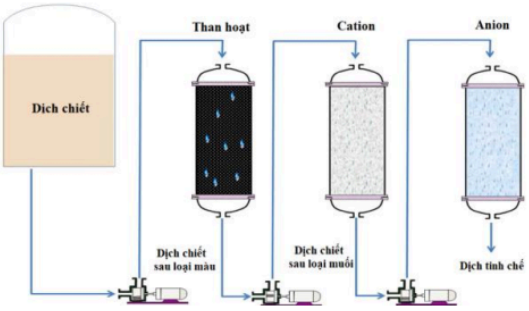
Phương pháp trao đổi ion dựa vào sự trao đổi thuận nghịch giữa các ion đã bị hấp phụ trên chất mang rắn và ion trong dung dịch. Các chất trao đổi ion có khả năng gắn kết với các phân tử ion hóa và tách chúng khỏi dung dịch. Chúng có thể có nguồn gốc tự nhiên như montmorillonit [50],[51],[52] hoặc tổng hợp như nhựa trao đổi ion [53]. Nhựa trao đổi ion là các polyme liên kết chéo, không tan trong nước, mang nhiều nhóm chức ion hóa tại các vị trí xác định trên chuỗi polyme và có thể trao đổi thuận nghịch ion đối của nó với các ion cùng điện tích trong dung dịch. Về cấu tạo, nhựa trao đổi ion gồm một polyme nền (R) liên kết cộng hóa trị với các nhóm liên kết (G) mang điện tích dương hoặc âm. Các ion đối (C) có khả năng trao đổi được gắn với các nhóm liên kết tạo trạng thái trung hòa về điện. Chất nền có thể được tạo thành từ polysaccharid, silica hoặc các polyme tổng hợp (polystyren, polyacrylat, polymethacrylat…) [53]. Bản chất hóa học của chất nền quyết định các tính chất lý hóa của hạt nhựa như tính cứng và độ bền cơ học, độ xốp, mức độ trương nở khi hydrat hóa và độ ổn định nhiệt và hóa học. Mỗi loại polyme có những ưu nhược điểm riêng và được ứng dụng trong những lĩnh vực cụ thể. Trong đó, nhựa trao đổi ion tổng hợp dựa trên chất nền polystyren được sản xuất và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược do các hạt nhựa đồng nhất về kích thước, mức độ liên kết chéo và hàm lượng các nhóm chức, đa dạng về chủng loại, có cấu trúc cầu nên dễ thao tác, ổn định về vật lý và hóa học. Thông thường, hạt nhựa được sản xuất bằng kỹ thuật polyme hóa với sự có mặt của tác nhân tạo liên kết chéo như divinyl benzen tạo ra các hạt rắn hình cầu, kích thước từ vài µm đến dưới 2 mm, màu trắng hoặc hơi vàng. Các nhóm chức đặc trưng cho mỗi loại nhựa có thể được tạo thành sau quá trình polyme hóa chất nền hoặc ngay trong quá trình polyme hóa bằng cách sử dụng các monome đã mang sẵn nhóm chức (acid acrylic, acid methacrylic). Trong cấu trúc nhựa trao đổi ion có nhiều lỗ xốp tạo ra diện tích bề mặt riêng lớn. Các nhóm liên kết phân bố dọc theo các chuỗi polyme tại các vị trí xác định. Chuỗi polyme có tính kỵ nước, ngược lại các nhóm chức có tính thân nước. Do đó, ngoài cơ chế trao đổi ion, cơ chế hấp phụ cũng giữ một vai trò nhất định trong tinh chế chọn lọc các phân tử đích [20],[53].

Nhựa trao đổi ion có 2 loại: nhựa trao đổi cation (chất mang tích điện âm có khả năng hấp phụ các phân tử tích điện dương) và nhựa trao đổi anion (chất mang tích điện dương có khả năng hấp phụ các phân tử tích điện âm). Ngoài ra có loại nhựa lưỡng tính có khả năng trao đổi đồng thời cả cation và anion. Nhựa có thể được hoàn nguyên và tái sử dụng nhiều lần. Các nhóm trao đổi hay gặp gồm: $-SO_3^-H^+$: nhóm trao đổi cation acid mạnh; $-COO^-H^+$: nhóm trao đổi cation acid yếu; $-CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$: nhóm trao đổi anion base mạnh; $-CH_2NH_3^+Cl^-$: nhóm trao đổi anion base yếu. Trong đó, các nhóm trao đổi acid mạnh và base mạnh thường tạo liên kết mạnh với hoạt chất, có thể gây khó khăn khi rửa giải bằng các tác nhân thông thường. Ngược lại, các nhóm trao đổi yếu sẽ dễ dàng được hoàn nguyên [20].

Phương pháp trao đổi ion được ứng dụng trong loại bỏ tạp chất (ví dụ dùng nhựa anion để loại tạp màu [20] hoặc dùng nhựa cation để loại bỏ alcaloid [54]) hoặc thu hồi chọn lọc hoạt chất từ dịch chiết [55]. Về kỹ thuật, phương pháp trao đổi ion cũng được tiến hành theo kỹ thuật mẻ hoặc kỹ thuật cột như phương pháp hấp phụ ở trên. Nếu để thu hồi hoạt chất từ dịch chiết, quy trình gồm các bước cơ bản: xử lý nhựa, hấp phụ, loại tạp và rửa giải [56].

Với cao chứa các hoạt chất nhóm alcaloid, nhựa trao đổi cation acid mạnh và yếu hay được sử dụng. Trong giai đoạn hấp phụ, pH dịch chiết thường được điều chỉnh dưới 3 để tăng khả năng trao đổi ion, đồng thời tỷ lệ ethanol trong dịch chiết có thể cao hơn so với phương pháp hấp phụ sử dụng nhựa macroporous. Điều này có nghĩa dịch chiết sau khi tinh chế qua nhựa macroporous có thể được tiếp tục tinh chế bằng phương pháp trao đổi ion để tăng hiệu quả loại tạp chất. Giai đoạn loại tạp thường sử dụng nước với tốc độ thấp hơn tốc độ nạp dịch ở giai đoạn hấp phụ. Giai đoạn rửa giải thường sử dụng cồn (nồng độ ethanol thường trên 50%), ammoni hydroxid, dung dịch natri clorid, hoặc dung dịch acid [56].

Alcaloid ephedrin được xem là các hoạt chất chính của dược liệu ma hoàng (*Ephedra sinica*), tuy nhiên chúng gây các tác dụng phụ như đánh trống ngực, tăng huyết áp, mất ngủ và bí tiểu. Do đó, chống chỉ định ma hoàng cho các bệnh nhân có các bệnh lý liên quan đến tim mạch. Một nhóm tác giả ở Nhật Bản quan sát thấy một số tác dụng của ma hoàng (như giảm đau) có thể không phải do các hoạt chất alcaloid ephedrin, do đó các tác giả đã nghiên cứu điều chế cao ma hoàng không chứa alcaloid ephedrin, nhằm phát triển một sản phẩm an toàn cho người bệnh. Dịch chiết nước (bằng phương pháp sắc) dược liệu ma hoàng được tinh chế bằng phương pháp trao đổi ion (sử dụng nhựa cation SK-1B do có khả năng liên kết tốt với các alcaloid ephedrin), sử dụng kỹ thuật cột tĩnh, sản phẩm là phần không bị giữ lại trên cột. Kết quả cho thấy, phương pháp trao đổi ion đơn giản giúp loại bỏ các alcaloid ephedrin hiệu quả. Cao ma hoàng không chứa alcaloid ephedrin an toàn hơn và có tác dụng giảm đau, kháng ung thư và kháng virus influenza tương đương cao ma hoàng khi thử nghiệm trên các mô hình *in vitro* và *in vivo* [54],[57],[58].



Hình 6. Sơ đồ minh họa quá trình tinh chế dịch chiết bằng cách kết hợp phương pháp hấp phụ và phương pháp trao đổi ion (kỹ thuật cột tĩnh)

4. Kết luận

Cao dược liệu là một sản phẩm chiết xuất đặc trưng, quan trọng và phổ biến nhất từ dược liệu. Để cao dược liệu đáp ứng các yêu cầu tinh khiết, an toàn và hiệu quả để ứng dụng trong dược phẩm, cần phát triển và áp dụng các công nghệ chiết xuất và tinh chế trong quy trình sản xuất. Nghiên cứu này đã cung cấp các thông tin cơ bản về các phương pháp tinh chế dịch chiết, áp dụng trong sản xuất cao dược liệu giàu hoạt chất như kết tủa, hấp phụ, chiết phân bố lỏng-lỏng, kết bông, tách màng, trao đổi ion. Việc lựa chọn phương pháp tinh chế phụ thuộc vào nhiều yếu tố như bản chất dịch chiết, tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm, điều kiện kỹ thuật, chi phí sản xuất và nhiều yếu tố khác. Trong nhiều trường hợp, cần phối hợp các phương pháp tinh chế để đạt hiệu quả theo mong muốn. Hiện nay, các xu hướng nghiên cứu hiện đại như tối ưu hóa quy trình sản xuất theo quan điểm "Chất lượng bởi thiết kế" (Quality by Design), kiểm soát quy trình trực tuyến (online) và sản xuất liên tục (tích hợp các quá trình xử lý dược liệu, chiết xuất, cô đặc, tinh chế và làm khô) đã, đang và sẽ được tiếp tục hoàn thiện và áp dụng trong thực tế để nâng cao chất lượng cao dược liệu nói riêng và các sản phẩm từ dược liệu nói chung.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam (2018), 5. **2.** Đại học Dược Hà Nội, Bộ môn Công nghiệp Dược (2017), Kỹ thuật chiết xuất dược liệu, NXB Y học. **3.** United State Pharmacopoeia 43 (2020). **4.** European Pharmacopoeia (2020), 10. **5.** Chinese Pharmacopoeia (2015). **6.** Bristish Pharmacopoeia (2020). **7.** Sun J., Qin L., Li G., Kang Y. (2013), Effect of hydraulic conditions on flocculation performances and floc characteristics in Chinese herbal extracts by chitosan and chitosan hydrochloride, *Chemical Engineering Journal*, 225(2013), 641-649. **8.** Falcone P. M., Tagliazucchi D., Verzelloni E., Giudici P. (2010), Sugar conversion induced by the application of heat to grape must, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8680-8691. **9.** Gong X., Wang S., Qu H. (2011), Comparison of two separation technologies applied in the manufacture of botanical injections: Second ethanol precipitation and solvent extraction, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(12), 7542-7548. **10.** Tai Y., Shen J., Luo Y., Qu H., Gong X. (2020), Research progress on the ethanol precipitation process of traditional Chinese medicine, *Chinese Medicine*, 15, 84-98. **11.** Zhao Q., Luan X., Zheng M., Tian X. H., Zhao J., Zhang W. D., Ma B. L. (2020), Synergistic mechanisms of constituents in herbal extracts during intestinal absorption: Focus on natural occurring nanoparticles, *Pharmaceutics*, 12(2), 128-146. **12.** Adolf N., Veronika B. (2010), Lessons learned from herbal medicinal products: The example of St. John's Wort, *Journal of Natural Products*, 73, 1015-1021. **13.** Gong X., Chen H., Chen T., Qu H. (2014), Unit operation optimization for the manufacturing of botanical injections using a design space approach: A case study of urater precipitation, *PLoS ONE*, 9(8), e104493. **14.** Koh G. Y., Chou G., Liu Z. (2009), Purification of a water extract of Chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by alcohol precipitation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 5000-5006. **15.** Gong X., Li Y., Qu H. (2014), Removing tannins from medicinal plant extracts using an alkaline ethanol precipitation process: a case study of Danshen injection, *Molecules*, 19(11), 18705-18720. **16.** Gong X., Wang S., Li Y., Qu H. (2013), Separation characteristics of

ethanol precipitation for the purification of the water extract of medicinal plants, *Separation and Purification Technology*, 107, 273-280. **17.** Gong X., Li Y., Guo Z., Qu H. (2014), Control the effects caused by noise parameter fluctuations to improve pharmaceutical process robustness: A case study of design space development for an ethanol precipitation process, *Separation and Purification Technology*, 132, 126-137. **18.** Pan J., Shao J., Qu H., Gong X. (2020), Ethanol precipitation of *Codonopsis Radix* concentrate with a membrane dispersion micromixer, *Journal of Cleaner Production*, 251, 119633. **19.** Sun M. F., Yang J. Y., Cao W., Shao J. Y., Wang G. X., Qu H. B., Huang W. H., Gong X. C. (2020), Critical process parameter identification of manufacturing processes of *Astragali Radix* extract with a weighted determination coefficient method, *Chinese Herbal Medicines*, 12(2), 125-132. **20.** Kammerer J., Carle R., Kammerer D. R. (2011), Adsorption and ion exchange: basic principles and their application in food processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 22-42. **21.** He B. L., Guo L. Q., Zheng Q. W., Lin S. X., Lin J. F., Wei T., Ye Z. W. (2018), A simple and effective method using macroporous resins for the simultaneous decoloration and deproteinisation of *Cordyceps militaris* polysaccharides, *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1741-1751. **22.** Linwu Z., Yan D., SafianMurad M., We X., Zhenzhong W., Jingbo Z. (2020), Continuous chromatography with multi-zone and multi-column dynamic tandem techniques for the isolation and enrichment of class compounds from natural products of *Panax notoginseng*, *Journal of Chromatography A*, 1629, 461499. **23.** Li J., Chase H. A. (2010), Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources, *Natural Product Reports*, 27(10), 1493-1510. **24.** Mantovaneli I. C. C., Ferretti E. C., R. Simões M., C. Ferreira da Silva (2004), The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous stevia-extract in a fixed-bed column with zeolites, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(3), 449-458. **25.** Bo M., Ashok K., Igor Y. G. (2010), *Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group. **26.** Li J., Chase H. A. (2009), Use of expanded bed adsorption to purify flavonoids from *Ginkgo biloba* L., *Journal of chromatography A*, 1216(50), 8759-8770. **27.** Jin X., Liu M., Chen Z., Mao R., Xiao Q., Gao H., Wei M. (2015), Separation and purification of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) from green tea using combined macroporous resin and polyamide column chromatography, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1002, 113-122. **28.** Wan J., Zhang Q., Ye W., Wang Y. (2008), Quantification and separation of protopanaxatriol and protopanaxadiol type saponins from *Panax notoginseng* with macroporous resins, *Separation and Purification Technology*, 60(2), 198-205. **29.** Yang J., Zhang L., Zhu G., Li L. (2014), Separation and enrichment of major quinolizidine type alkaloids from *Sophora alopecuroides* using macroporous resins, *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 945-946, 17-22. **30.** Gao H., Huang L., Ding F., Yang K., Feng Y., Tang H., Xu Q. M., Feng J., Yang S. (2018), Simultaneous purification of dihydrotanshinone, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* and their anti-inflammatory activities investigation, *Scientific Reports*, 8(1), 8460. **31.** Yang Y., Zhu R., Li J., Yang X., He J., Wang H., Chang Y. (2019), Separation and enrichment of three coumarins from *Angelicae Pubescentis* radix by macroporous resin with preparative HPLC and evaluation of their anti-inflammatory activity, *Molecules*, 24(14), 2664-2678. **32.** Trần Trọng Biên, Lê Ngọc Khánh (2019), Nghiên cứu quy trình chiết xuất cao khô lá Chè xanh đạt tiêu chuẩn hàm lượng EGCG và giới hạn cafein theo USP 42, *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 10(4+5+6), 34-42. **33.** Trần Trọng Biên, Nguyễn Thị Phương Dung, Nguyễn Thị Tâm, Đoàn Huy Hoàng, Hà Vân Oanh, Chử Thị Thanh Huyền, Luyện Bùi Thị Thúy (2020), Nghiên cứu chiết xuất và làm giàu acid salvianolic B và tanshinon IIA trong cao rễ đan sâm, *Tạp chí Y Dược học*, (8), 42-49. **34.** Zhao J., Yao S., Lin D. (2009), Adsorbents for Expanded Bed Adsorption : Preparation and Functionalization, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(4), 678-687. **35.** Li J., Chase H. A. (2009), Characterization and evaluation of a macroporous adsorbent for possible use in the expanded bed adsorption of flavonoids from *Ginkgo biloba* L., *Journal of Chromatography. A*, 1216(50), 8730-8740. **36.** 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. **37.** 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. **38.** An X., Kang Y., Qin L., Tian Y., Li G. (2017), Purification of Chinese herbal extract with chitosan hydrochloride: Flocculation of single impurity and flocculation mechanism, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(6), 1756-1762. **39.** Liu J., Tian Y., An X., Li G., Kang Y. (2015), Flocculation Performance and Mechanism of Removing Pectin by N-hydroxypropyl Trimethyl Ammonium Chloride Chitosan, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36(11), 1612-1620. **40.** Li G. (2016), Removing impurities from herbal medicines, *Filtration + Separation*, 53(6), 40-44. **41.** Li G., Ren B., Cheng L., Tao S. (2016), The purification of herbal medicines, *Filtration + Separation*, 53(1), 28-32. **42.** Yang K., Guo Z. B., Li K. P. (2020), Membrane–based separation and concentration of total flavone glycosides from *Desmodium styracifolium*, *E3S Web of Conferences*, 145, 01016. **43.** Li B., Huang M., Fu T., Pan L., Yao W., Guo L. (2012), Microfiltration process by inorganic membranes for clarification of TongBi liquor, *Molecules*, 17(2), 1319-1334. **44.** Cesar de M. C., Chiu M. C., Basso R. C., Ribeiro A. P. B., Gonçalves L. A. G., Viotto L. A. (2009), State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review, *Food Research International*, 42(5-6), 536-550. **45.** Qiao X., Zhang Z., Ping Z. (2007), Hydrophilic modification of ultrafiltration membranes and their application in *Salvia Miltiorrhiza* decoction, *Separation and Purification Technology*, 56(3), 265-269. **46.** Frahn J., Malsch G., Schwarz H. H. (2003), Photo-initiated generation of a selective layer on polyacrylonitrile (PAN) composite membranes, *Journal of Materials Processing Technology*, 143-144, 277-280. **47.** Mathias U., Georges B. (1996), Surface modification of ultrafiltration membranes by low temperature Plasma Ii. Graft polymerization onto polyacrylonitrile and polysulfone, *Journal of Membrane Science*, 111(2), 193-215. **48.** Michelle L. S., Lynley H., Elizabeth D. H., Nathan E. C., David G. C., Ellen R. F. (2001), Low temperature plasma treatment of asymmetric polysulfone membranes for permanent hydrophilic surface modification, *Journal of Membrane Science*, 188(1), 97-114. **49.** Pi K. W., Li Z., Wan D. J., Gao L. X. (2011), Cleaner production of ephedrine from *Ephedra sinica* Stapf by membrane separation technology, *Chemical Engineering Research and Design*, 89(12), 2598-2605. **50.** Trần Trọng Biên, Nguyễn Thu Hà, Nghiêm Thị Minh, Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Văn Hân (2019), Nghiên cứu loại cafein từ cao lá Chè xanh bằng Montmorillonite, *Tạp chí Dược học*, 59(516), 42-45, 53. **51.** Shiono T., Yamamoto K., Yotsumoto Y., Kawai J., Imada N., Hioki J., Naganuma H., Eguchi T., Kurihara M., Yoshida A., Deuchi K. (2017), Selective decaffeination of tea extracts by montmorillonite, *Journal of Food Engineering*, 200, 13-21. **52.** Shiono T., Yamamoto K., Yotsumoto Y., Yoshida A. (2017), Caffeine adsorption of montmorillonite in coffee extracts, *Biosci Biotechnol Biochem*, 81(8), 1591-1597. **53.** Trần Trọng Biện, Vũ Mai Hương, Bùi Thị Thúy Luyện, Nguyễn Văn Hân (2017), Nhựa trao đổi ion và các tiềm năng ứng dụng trong Y Dược học, *Tạp chí Dược học*, 57(499), 7-13. **54.** Oshima N., Yamashita T., Hyuga S., Hyuga M., Kamakura H., Yoshimura M., Maruyama T., Hakamatsuka T., Amakura Y., Hanawa T., Goda Y. (2016), Efficiently prepared ephedrine alkaloids-free *Ephedra* Herb extract: a putative marker and antiproliferative effects, *J Nat Med*, 70(3), 554-62. **55.** Bristish Pharmacopoeia (2020), Refined and Standardised Fresh Bilberry Fruit Dry Extract. **56.** He Y., Chen Z., Qu

H., Gong X. (2020), Research progress on the separation of alkaloids from Chinese medicines by column chromatography, *Advances in Chemical Engineering and Science*, 10(4), 358-377. **57.** Nakamori S., Takahashi J., Hyug S., Yang J., H. Takemoto, T. Maruyama, N. Oshima, N. Uchiyama, Y. Amakura, M. Hyuga, T. Hakamatsuka, Y. Goda, H. Odaguchi, T. Hanawa, Y. Kobayashia (2019), Analgesic effects of *Ephedra* herb extract, ephedrine alkaloids–free *Ephedra* herb extract, ephedrine, and pseudoephedrine on formalin-induced pain, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(9), 1538–1544. **58.** Hyuga S., Hyuga M., Oshima N., Maruyama T., Kamakura H., Yamashita T., Yoshimura M., Amakura Y., Hakamatsuka T., Odaguchi H., Goda Y., Hanawa T. (2016), Ephedrine alkaloids-free *Ephedra* herb extract: a safer alternative to ephedra with comparable analgesic, anticancer, and anti-influenza activities, *Journal of Natural Medicines*, 70(3), 571-583.

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

Tạp chí Dược liệu, tập 26, số 6/2021 (Trang 277 - 281)

CÁC TRITERPENOID TỪ PHÂN ĐOẠN ETHYL ACETAT NẤM *GANODERMA COCHLEAR* (NEES) MERR., HỌ GANODERMATACEAE

Nguyễn Thị Duyên[1,*], Trần Thị Tuyết[2], Hoàng Đức Mạnh[1], Lê Thành Nghị[1], Nguyễn Phương Đại Nguyên[3], Nguyễn Văn Tài[1]

[1]Viện Dược liệu; [2]Đại học Đại Nam; [3]Đại học Tây Nguyên

*Email: nguyenduyen6784@gmail.com

(Nhận bài ngày 21 tháng 7 năm 2021)

Tóm tắt

5 Hợp chất triterpenoid gồm acid lucidenic E2 (**1**), fornicatin F (**2**), fornicatin D (**3**), acid 3*β*,7*β*,15*α*,24-tetrahydroxy-11,23-dioxo-lanost-8-en-26-oic (**4**) và resinacein S (**5**) được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat của nấm *Ganoderma cochlear*, thu hái tại Tây Nguyên. Cấu trúc hoá học các chất được xác định dựa trên các dữ liệu phổ (NMR và MS) và so sánh với tài liệu tham khảo. Các hợp chất **1**, **4** và **5** lần đầu tiên được phân lập từ loài *G. cochlear*.

Từ khóa: *Ganoderma cochlear, Fornicatin F, Fornicatin D, Acid lucidenic E2.*

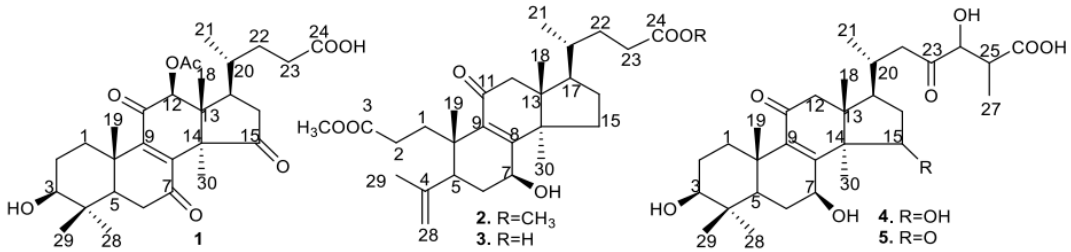
Summary

Triterpenoids from the Ethyl Acetate Fraction of *Ganoderma cochlear* (Nees) Merr.

Five triterpenoids, lucidenic E2 acid (**1**), fornincatin F (**2**), fornicatin D (**3**), 3β,7β,15α,24-tetrahydroxy-11,23-dioxo-lanost-8-en-26-oic acid (**4**), and resinacein S (**5**) were isolated from the ethyl acetate fraction of *Ganoderma cochlear*, collected in Tay Nguyen. Their structures were elucidated by spectral data (NMR and MS) and compared with the reported literatures. Compounds **1**, **4** and **5** were isolated from *G. cochlear* for the first time.

Keywords: *Ganoderma cochlear, Fornicatin F, Fornicatin D, Lucidenic E2 acid.*

1. Đặt vấn đề



Hình 1. Cấu trúc hoá học các hợp chất **1** - **5** từ loài *Ganoderma cochlear*

Đối tượng nấm nghiên cứu có tên khoa học là *Ganoderma cochlear* (Nees) Merr. thuộc họ Ganodermataceae. Hiện nay, các nghiên cứu trong nước về loài chỉ dừng lại ở đa dạng và phân loại loài [1]. *G. cochlear* mọc khá phổ biến ở Tây Nguyên, và được đồng bào ở đây sử dụng như dược liệu có tác dụng tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ tiêu hoá. Các công bố về thành phần hoá học loài *G. cochlear* đã chỉ ra có trên 90 hợp chất từ nấm bao gồm chủ yếu là các triterpenoid (lanostan-triterpenoid và meroterpenoid), sterol và đặc biệt có sự xuất hiện của alcaloid [2],[3],[4],[5],[6],[7],[8],[9],[10],[11],[12]. Các hợp chất này được phát hiện có hoạt chống oxy hoá [11], chống viêm [4], bảo vệ gan [2], ức chế tăng sinh tế bào NRK-49F gây bởi yếu tố TGF-β1 [3],[6],[7],[8]. Tiếp nối các nghiên cứu về thành phần hoá học của các loài thuộc chi *Ganoderma* tại Tây Nguyên, trong bài báo này, 5 triterpenoid (**1** - **5**) được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat nấm *G. cochlear* và đã được xác định cấu trúc hoá học (Hình 1).

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nấm thu hái vào tháng 11/2020 tại 3 vườn quốc gia Bidup núi Bà, Chư Yang Sin và