TỐI ƯU QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT ALKALOID TỪ CÂY ÍCH MẪU

Tạ Thị Lượng[1,2], Nguyễn Văn Tùng[1], Lê Thị Nga[1],
Cao Thị Duyên[1], Vi Đại Lâm[1], Đinh Thị Kim Hoa[1], Nguyễn Thị Tình[1],
Trần Văn Chí[1], Ngô Xuân Bình[1], Lưu Hồng Sơn[1*]

Tóm tắt: *Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố loại dung môi, nồng độ dung môi, thời gian tách chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, ảnh hưởng tới quá trình tách chiết alkaloid từ cây ích mẫu cho kết quả tương ứng: C_2H_5OH, 80%, 24 giờ, 6/1 (ml/g). Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện chiết tách, chúng tôi nhận thấy, nồng độ dung môi, thời gian tách chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box- Behnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết alkaloid từ cây ích mẫu như sau: Nồng độ ethanol 77,81%, thời gian tách chiết 24,24 giờ, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 5,93/1 (ml/g). Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.*

Từ khóa: Ích mẫu; Alkaloid; Tách chiết; Tối ưu; Box- Behnken.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ích Mẫu hay còn gọi là Sung Uý, Chói Đèn, Làm Ngài, Xác Điến (Tày), Chạ Linh Lo (Thái). Tên khoa học là *Leonurus japonicas* Houtt., thuộc họ hoa môi (Lamiaceae), hạt gọi là sung úy tử. Chi *Leonurus L*. có 8 loài, phân bố ở vùng ôn đới ấm, cận nhiệt đới và nhiệt đới châu Âu, châu Á và châu Mỹ [1, 2].

Ích mẫu có tác dụng hành huyết thông kinh, tức là làm cho máu trong cơ thể được tuần hoàn đều đặn, thông suốt trong lòng mạch. Chỉ định trong những trường hợp huyết mạch lưu thông kém gây sưng đau [3]. Ngoài ra, ích mẫu còn có tác dụng lợi thủy tiêu phù, dùng để trị các bệnh viêm thận gây phù, dùng riêng 40 – 100 g sắc nóng hoặc phối hợp với xa tiền, bạch mao căn [2]. Tác dụng của cây ích mẫu được chứng minh chủ yếu là do tác dụng của nhóm hoạt chất alkaloid [4, 6]. Tác dụng của cây ích mẫu được chứng minh chủ yếu là do tác dụng của nhóm hoạt chất alkaloid. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công trình tối ưu tách chiết alkaloid từ cây ích mẫu. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu là nhằm tối ưu hóa quá trình tách chiết alkaloid tổng số từ cây ích mẫu tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây ích mẫu (*Leonurus japonicas* Houtt.) được thu mua tại xã Bản Luốc, huyện Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang đã được định danh kết luận loài và phần thân, lá cây được sử dụng để phân tích. Nguyên liệu được rửa sạch, sau đó đem đi sấy ở nhiệt độ 60°C đến độ ẩm dưới 10%. Tiến hành bảo quản trong túi PE đặt trong hộp nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng và ẩm, thời gian bảo quản mẫu 15 ngày.

Dung môi: các dung môi, hóa chất được sử dụng trong chiết xuất và phân tích đạt tiêu chuẩn PA.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Alkaloid được chiết từ cây ích mẫu bằng dung môi ethanol; methanol; nước với nồng độ khác nhau trong thời gian 20; 22; 24 và 26 giờ với tỷ lệ dung môi: nguyên liệu lần lượt là 2:1; 4:1; 6:1 và 8:1 (v/w). Sau khi tiến hành khảo sát các đơn nhân tố, chúng tôi lựa chọn 03 yếu tố là các yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng alkaloid tổng số trong cây ích mẫu, để đánh giá khả năng ảnh hưởng của chúng, chúng tôi sử dụng phương pháp bề

mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box - Behnken với ba yếu tố, ba cấp độ.

2.3. Xác định alkaloid tổng số

Cây ích mẫu được thu hái, sau đó phơi khô tán nhỏ thành dạng bột, chiết alkaloid toàn phần bằng ethanol 70 %. Cân chính xác 100 g bột thô dược liệu. Ngấm kiệt bằng ethanol (đã axit hóa bằng dung dịch axit sulfuric 10 %), ngâm trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng.

Rút dịch chiết với tốc độ 15 giọt/phút, đến khi hết alkaloid (kiểm tra bằng thuốc thử Bouchardat). Gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi đến áp suất giảm đến còn khoảng 5 ml. Thêm ether dầu hỏa (30 °C đến 60 °C) để loại tạp (3 lần x 5 ml). Kiềm hóa dịch chiết đến pH = 10 bằng amoniac đậm đặc. Chiết alkaloid toàn phần bằng chloroform (3 lần x 10 ml). Gộp dịch chloroform, bay hơi trên cách thủy tới cắn, sấy cắn ở 50 °C đến khối lượng không đổi, cân và tính hàm lượng alkaloid toàn phần.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết

Từ kết quả bảng 1 cho thấy, khi chiết ở các loại dung môi khác nhau sẽ cho hàm lượng alkaloid khác nhau. Hàm lượng alkaloid cao nhất khi chiết với C_2H_5OH đạt 1,31g, tiếp theo là CH_3OH đạt 1,15g và hàm lượng alkaloid thấp nhất khi chiết với dung môi H_2O đạt 0,98g. Vì vậy, dung môi C_2H_5OH là thích hợp nhất để thực hiện quá trình tách chiết alkaloid từ cây ích mẫu. Kết quả này được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. *Kết quả khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi chiết đến hàm lượng alkaloid.*

Công thức	Dung môi	Hàm lượng alkaloid (g/100g)
CT1	H_2O	$0,98^c$
CT2	CH_3OH	$1,15^b$
CT3	C_2H_5OH	$1,31^a$

Ghi chú: Trên cùng 1 cột các giá trị mang cùng chữ số mũ thì khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết

Từ kết quả bảng 2 cho thấy, khi chiết ở nồng độ khác nhau thì sẽ cho hàm lượng alkaloid khác nhau và hàm lượng alkaloid bắt đầu tăng lên khi chiết ở nồng độ từ 60% đến 70%. Hàm lượng alkaloid đạt cao nhất tại nồng độ ethanol 80% tương ứng với hàm lượng alkaloid đạt 1,63g. Tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 90% thì hàm lượng alkaloid giảm xuống 1,91g. Do vậy, nồng độ ethanol 80% là thích hợp nhất để thực hiện quá trình tách chiết alkaloid từ cây ích mẫu. Kết quả này được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. *Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết.*

Công thức	Nồng độ (%)	Hàm lượng alkaloid (g/100g)
CT1	60	$1,14^c$
CT2	70	$1,31^b$
CT3	80	$1,63^a$
CT4	90	$1,29^b$

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha<0,05$.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Từ bảng 3 ta thấy, thời gian tách chiết có ảnh hưởng đến quá trình chiết tách alkaloid từ cây ích mẫu. Ta có thể nhận thấy, hàm lượng alkaloid tăng khi tăng thời gian chiết từ 20 giờ đến 22 giờ. Tiếp tục tăng thời gian chiết lên 24 giờ thì hàm lượng alkaloid tiếp tục tăng từ 1,23 lên 1,64g. Tuy nhiên, khi tăng thời gian chiết lên 26 giờ thì hàm lượng alkaloid giảm xuống còn 1,32g. Khi chiết ở thời gian là 24 giờ thì cho hàm lượng alkaloid là cao nhất. Nghiên cứu của Trần Thị Văn Thi [5], đã nghiên cứu tách chiết alkaloid từ lá vông nem có kết quả tương đồng với thí nghiệm của chúng tôi. Kết quả này được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. *Ảnh hưởng của thời gian chiết.*

Công thức	Thời gian chiết (giờ)	Hàm lượng alkaloid (g/100g)
CT1	20	1,13[d]
CT2	22	1,23[c]
CT3	24	1,64[a]
CT4	26	1,32[b]

Ghi chú: các chữ số trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức α=0,05.

3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu

Từ bảng 4 ta thấy được, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu có ảnh hưởng tới hàm lượng alkaloid được chiết từ cây ích mẫu. Hàm lượng alkaloid trong dịch chiết tăng lên khi tỷ lệ: dung môi/nguyên liệu tăng. Từ tỷ lệ 2/1 đến 6/1, hàm lượng alkaloid tăng từ 1,65g lên 2,1g, ở công thức tỷ lệ 6/1 và 8/1 không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình. Vì vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp là 6/1 để tránh lãng phí, tiết kiệm dung môi.

Bảng 4. *Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi trên nguyên liệu.*

Công thức	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (ml/g)	Hàm lượng alkaloid (g/100g)
CT1	2/1	1,65 [c]
CT2	4/1	1,87 [b]
CT3	6/1	2,1 [a]
CT4	8/1	2,12[a]

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức α=0,05

3.5. Tối ưu hóa quá trình tách chiết

Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box Behnken với ba biến ba cấp độ. Các số liệu thu được từ dịch chiết vỏ cây ngũ gia bì chân chim được xử lý trên phần mềm DesignExpert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh giá kết quả thu được. Tiến hành giải bài toán tối ưu theo phương pháp "hàm mong đợi". Sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó, hàm lượng alkaloid là cao nhất. Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng alkaloid: $Y= +2,07 – 0,078*A + 0,040*B – 0,057*C + 0,035*A*B – 0,010*A*C – (5,000E-0,03)*B*C – 0,014*A^2 – 0,015*B^2 – 0,53*C^2$

Trong đó, Y là hàm lượng alkaloid trong dịch chiết dự báo thu được.

Bảng 5. *Ma trận thực nghiệm Box- Behnken ba yếu tố chiết alkaloid từ cây ích mẫu.*

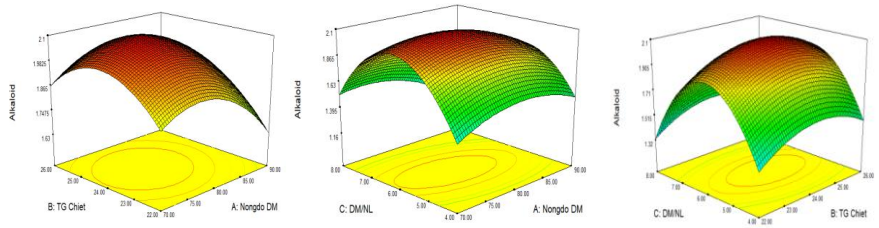
TN	Biến thực			Hàm lượng alkaloid (g/100g)
	A (nồng độ dung môi)	B (Thời gian chiết)	C (Tỷ lệ DM/NL)	
1	70	22	6/1	1,8
2	90	22	6/1	1,68
3	70	26	6/1	1,82
4	90	26	6/1	1,8
5	70	24	4/1	1,48
6	90	24	4/1	1,46
7	70	24	8/1	1,55
8	90	24	8/1	1,13
9	80	22	4/1	1,39
10	80	26	4/1	1,5
11	80	22	8/1	1,29
12	80	26	8/1	1,39
13	80	24	6/1	2,08
14	80	24	6/1	2,09
15	80	24	6/1	2,1
16	80	24	6/1	2,08
17	80	24	6/1	2,09

Để đánh giá mô hình chúng tôi sử dụng phân tích ANOVA. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng sau:

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	chaGiá trị p
Model	1,63	9	0,18	101,62	< 0,0001
A	0,42	1	0,042	23,63	0,0018
B	0,015	1	0,015	8,61	0,0219
C	0,028	1	0,028	15,52	0,0056
AB	$2{,}5.10^{-3}$	1	$2{,}5.\ 10^{-3}$	1,41	0,0274
AC	0,040	1	0,040	22,48	0,0021
BC	$2{,}5.\ 10^{-5}$	1	$2{,}5.\ 10^{-5}$	0,014	0,0909
A^2	0,095	1	0,095	53,42	0,0002
B^2	0,11	1	0,11	62,68	0,0001
C^2	1,20	1	1,20	671,64	< 0,0001
Residual	0,012	7	$1{,}779.\ 10^{-3}$		
Lack of Fit	0,012	3	$4{,}058.10^{-3}$	57,98	0,19
Sai số	$2{,}8.\ 10^{-4}$	4	$7.\ 10^{-5}$		
SS tổng Số	1,64	16			

SS: *Tổng phương sai;* DF*:Bậc tự do;* MS*: Trung bình phương sai;* chuẩn F*: Chuẩn Fisher;* Residual*: Phần dư*; "Lack of Fit": *Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm.*

Từ kết quả phân tích ANOVA ta thấy, giá trị xác suất của mô hình P-value = 0,0001<0,05, do đó, mô hình được cho kết quả của thí nghiệm, Lack of fit test = 0.19 (not significant) có ý nghĩa đối với mô hình.



(a) (b) (c)

Hình 1. *Bề mặt đáp ứng hàm lượng alkaloid.*
a. Mô hình tương tác giữa thời gian chưng cất và nồng độ dung môi;
b. Mô hình tương tác giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và nồng độ dung môi;
c. Mô hình tương tác giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian chưng cất.

Phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ dung môi là 77,81 %, thời gian chưng cất 24,24 giờ, tỷ lệ dung môi trên nguyên liệu là 5,93/1, alkaloid đạt 2,0996g. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm cho kết quả tương ứng.



Hình 2. *Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu ở hàm lượng alkaloid.*

4. KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp phân tích đơn yếu tố, thí nghiệm sau kế thừa kết quả nghiên cứu của thí nghiệm trước. Lựa chọn dung môi chiết là C_2H_5OH, nồng độ dung môi 80%, thời gian chiết 24 h, tỷ lệ dung môi trên nguyên liệu là 6/1 (ml/g). Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box- Behnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết dịch chiết của cây ích mẫu như sau: Nồng độ ethanol 77,81%, thời gian tách chiết 24,24 h, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 5,93/1 (ml/g) cho hàm lượng alkaloid là 2,0996g/100g.

Bài báo này đã được báo cáo tại Hội thảo Quốc gia *"Ứng dụng Công nghệ cao vào thực tiễn – 60 năm phát triển Viện KH-CN quân sự"*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Bộ Y tế, Hội đồng Dược điển Việt Nam (2010), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, chuyên luận "Ích Mẫu".

[2]. Bộ Y tế, Vụ Khoa học và Đào tạo (2006), *"Dược học cổ truyền"*, Mã số: Đ.20.Z.01, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, trang 235-236.
[3]. Đỗ Tất Lợi (2000), "*Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam"*, NXB Y học, TPHCM, trang 30 – 33.
[4]. Huỳnh Thị Mai Trang, Võ Thị Kim Hương, Hà Diệu Ly, 2012. "*Chiết xuất tinh chế hispanon và leoheteronin B từ ích mẫu để làm chất đối chiếu*". Tạp chí Dược học. Số 440, trang 20-23
[5]. Trần Thị Văn Thi, Trần Thanh Minh (2011), *"Nghiên cứu phân lập và nhận dạng cấu trúc alkaloid trong dịch chiết từ lá vông nem (Erythrina Orientalis L. Fabaceae) Thừa Thiên Huế,* Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, số 65.
[6]. Moon, H.I., 2010. *"Three diterpenes from Leonurus protect primary cultured rat cortical cells from glutamate – induced toxicity"*. Phytother. Res 24, 1256 – 1259.

ABSTRACT

OPTIMIZING THE EXTRACTION PROCESS OF ALKALOID FROM THE LEONURUS JAPONICAS HOUTT

The purpose of this sudy was to investigate the one way solvent type, solvent concentration, extraction time and the ratio of material/solvent extraction, which affected the extraction process of alkaloid from Leonurus japonicas Houtt. resulting in C_2H_5OH; 80%; 24 hours; 6/1 (v/w). On the basis of the factors affecting the extraction conditions, we found that the solvent concentration, extraction time and solvent/material ratio strongly influence the extraction process. Application of Box-Behnken design found the optimal condition for the extraction process of alkaloid from Leonurus japonicas Houtt. With solvent concentration of 77.81%, extraction time of 24,24 hours, solvent/raw ratio whether it is 5.93/1 (v/w), which created the amount of alkaloid of 2.0996 g. Experimental results showed high degree of compatibility with the model.

Keywords: Alkaloid; Extraction; Optimize; Leonurus japonicas Houtt.; Box-Behnken.

Nhận bài ngày 10 tháng 7 năm 2020
Hoàn thiện ngày 09 tháng 10 năm 2020
Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 10 năm 2020

Địa chỉ: [1]Trường Đại học Nông lâm – Đại học Thái Nguyên;
[2]Đại học Queensland.
[*]Email: luuhongson@tuaf.edu.vn.