



Nghiên cứu áp dụng phương pháp tinh chế hệ dung môi cồn muối làm giàu saponin từ ngưu tất

STUDY OF APPLYING SALT ALCOHOL SOLVENT PURIFICATION METHOD ENRICHED FROM "ACHYRANTHES ASPERA L."

Nguyễn Thị Khánh Huyền¹, Phạm Thủy Phương¹, Trần Thị Thu Hiền¹

Hoàng Lê Sơn², Trần Minh Ngọc², Phạm Quốc Bình¹

¹Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

²Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Điều kiện tinh chế saponin từ ngưu tất (*Achyranthes bidentata* Blume) bằng phương pháp hệ hai pha cồn muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được xác định dựa vào thiết kế thí nghiệm đáp ứng bề mặt (RSM). Saponin toàn phần theo acid oleanolic định lượng bằng đo UV-Vis dựa trên phản ứng Rosenthaler. Kết quả cho thấy tại điều kiện tối ưu gồm khối lượng EtOH 34.4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18g và khối lượng nước 42.5g, saponin tập trung chủ yếu tại lớp trên của hai pha với khả năng thu hồi lên tới 83.79%. Áp dụng điều kiện này, cao ngưu tất ban đầu với hàm lượng saponin 7.5% được tinh chế tăng gấp đôi 15.5% (g/g). Trong khi đó, hàm lượng saponin trong cao khi áp dụng phương pháp cổ điển hai pha không đồng tan n-butanol/ H_2O chỉ khoảng 13.3%. Phương pháp này cho thấy hiệu quả cao trong việc làm giàu saponin, dễ nâng cấp quy mô, và dung môi thân thiện với môi trường.

ABSTRACT

The conditions of purification of saponin from *Achyranthes bidentata* Blume by the aqueous two-phase system of salt alcohol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were determined based on the design of response surface methodology (RSM). Total saponin according to oleanolic acid quantified by UV-Vis measurement based on Rosenthaler reaction. The results showed that at the optimal condition including EtOH 34.4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18g and 42.5g water, saponin concentrated mainly in the top phase of two phases with recovery up to 83.79%. Applying this condition, the original sage with a refined 7.5% saponin content doubled 15.5% (g/g). Meanwhile, the concentration of saponin when applying the classical two-phase method of n-butanol/ H_2O is only about 13.3%. This method has been shown to be highly effective in enriching saponin, easy to scale up, and environmentally friendly solvents.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngưu tất với tên khoa học *Achyranthes bidentata* Blume (Họ Amaranthaceae) được phân phối rộng

rãi ở các nước châu Á như Hàn Quốc, Nhật Bản và Trung Quốc. Từ lâu rồi ngưu tất đã được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền như một vị thuốc bổ,

Ngày nhận bài: 10/2/2021

Ngày phản biện: 11/2/2021

Ngày chấp nhận đăng: 12/2/2021

hoặc để điều trị chứng ứ máu, lợi tiểu, điều kinh nguyệt, đau xương khớp, cải thiện chức năng gan thận [1-3, 8]. Trong rễ ngưu tất, nhiều thành phần được phân lập và xác định cấu trúc hoá học như các saponin, flavonoids, đường đơn, đường đa. Giữa các nhóm này, saponin được xác định là thành phần chính liên quan tới tác dụng sinh học của rễ cây ngưu tất [10]. Một số kỹ thuật làm giàu saponin từ ngưu tất đã được công bố như lactic phân đoạn *n*-butanol/ H_2O hay ứng dụng nhựa đa ion [4]. Gần đây, kỹ thuật ATPS sử dụng hệ hai dung môi đồng tan tách lớp thành hai pha bởi sự xuất hiện của muối được chú ý nhiều hơn để tinh chế các chất có khối lượng phân tử nhỏ như saponin, anthocyanins, flavones, chlorogenic acid [5, 7, 11]. Quy trình của phương pháp này đơn giản, thân thiện với môi trường, và dễ nâng cấp ở quy mô công nghiệp [9, 10]. Do chưa có nghiên cứu áp dụng kỹ thuật này để tinh chế saponin từ ngưu tất, chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu áp dụng phương pháp tinh chế hệ dung môi cồn muối làm giàu saponin từ ngưu tất**”.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là rễ cây ngưu tất đã được giám định tên khoa học là *Achyranthes bidentata* Blume và lưu giữ tại khoa Bào chế - Chế biến, Viện Dược liệu. Rễ sau khi mua về được làm sạch, sấy khô và chiết cồn 96° thu được cao ngưu tất hàm lượng saponin toàn phần 7.5%.

Thiết bị, hóa chất nghiên cứu

Máy quang phổ UV – Vis 18, máy cô quay, máy đo hàm ẩm, máy siêu âm, tủ sấy, cân phân tích, cồn kè, dụng cụ khác.

Hóa chất: EtOH, MeOH, acid acetic, vanillin, butanol, $(NH_4)_2SO_4$, $HClO_4$, nước RO, chất chuẩn acid oleanolic.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp định lượng saponin

Xử lý mẫu: hòa tan cao bằng nước, lắc butanol (1:1x4 lần), thu dịch butanol đem cô cạn, hòa tan bằng MeOH.

Định lượng: Phương pháp đo quang, dựa trên phản ứng Rosenthaler giữa acid oleanolic với thuốc thử acid perchloric và vanillin trong acid acetic băng.

Phương pháp tạo hệ dung môi cồn muối

Đề tài tiến hành khảo sát thành phần pha muối $(NH_4)_2SO_4$, K_2CO_3 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 với pha cồn là ethanol. Kết quả cho thấy hệ dung môi cồn muối tạo bởi $(NH_4)_2SO_4$ và EtOH cho hiệu quả cao nhất. Xây dựng giản đồ pha hệ EtOH- $(NH_4)_2SO_4$ theo phương pháp chuẩn độ đo độ đục.

Tiến hành hòa tan hoàn toàn muối $(NH_4)_2SO_4$ vào nước, thêm một lượng cao vào siêu âm tan hoàn toàn. Sau đó thêm EtOH vào và khuấy từ 30 phút. Để yên sẽ thấy hệ tách thành 2 pha, ghi lại thể tích mỗi pha. Pha dưới có thể tích là V_2 ml. Pha trên (V_1 ml), đem cô cạn và định lượng saponin.

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến hệ dung môi cồn muối

Đề tài tiến hành khảo sát các yếu tố sau: Khối lượng cồn, khối lượng muối, khối lượng nước, nhiệt độ. Thực hiện như sau:

STT	Yếu tố thay đổi	Yếu tố cố định
1 – 5	m_{EtOH} : 16, 18, 20, 22, 24 (g)	$m_{(NH_4)_2SO_4}$: 30 (g) Nước thêm vào đủ 100 (g) Nhiệt độ phòng
6 – 10	$m_{(NH_4)_2SO_4}$: 20, 25, 30, 35, 40 (g)	m_{EtOH} : 20 (g) Nước thêm vào đủ 100 (g) Nhiệt độ phòng
11 - 15	Nhiệt độ: Nhiệt độ phòng, 40, 50, 60, 70°C	m_{EtOH} : 20 (g) $m_{(NH_4)_2SO_4}$: 30 (g) Nước thêm vào đủ 100 (g) Nhiệt độ phòng



Mỗi điều kiện thêm 0.5g cao ngưi tấ. Tách lấy pha trên, cô cầ và địn lượng saponin. Đán giá điều kiện đon yếu tố cho hiệu quả tinh chế saponin cao nhất dựa vào hàm mục tiêu là năng suất thu hồi saponin pha trên R(%).

$$R = \frac{m(t)}{m} 100\%$$

Trong đó: mt: Khối lượng saponin pha trên;
m: Khối lượng saponin tổng.

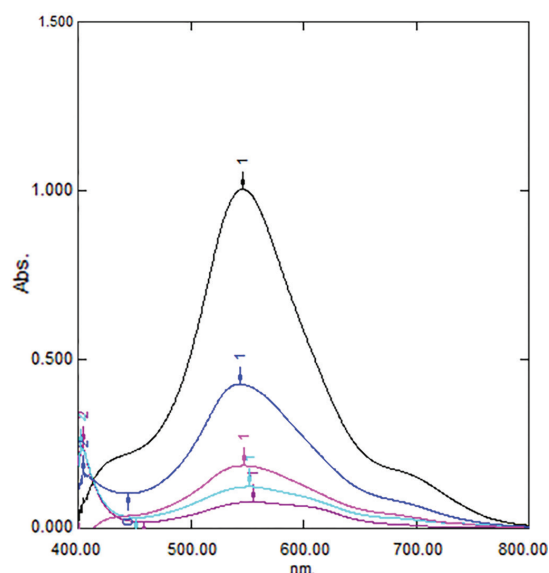
Tối ưu hóa hệ dung môi cồn muối

Tiến hành tối ưu hóa quá trình tinh chế bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, sử dụng thiết kế cấu trúc có tâm (CCD) [6]. Ba biến (A, B, C) đưa vào khảo sát là 3 yếu tố ảnh hưởng nhất đến hệ dung môi. Cài đặt các yêu cầu riêng cho từng biến (tối thiểu, tối đa, trong khoảng giới hạn) sau đó phân tích các phương án tương ứng với các điều kiện chiết xuất thỏa mãn yêu cầu vừa cài đặt và mức kì vọng của phương án. Từ đó, lựa chọn phương án tối ưu dựa trên hàm mục tiêu là R cao nhất. Phương án thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm, trong đó có 8 thí nghiệm của quy hoạch toàn phần, 6 thí nghiệm xung quanh trục và 3 thí nghiệm tại tâm. Tiến hành làm giàu saponin ở các điều kiện dung môi cồn muối khác nhau, tách pha trên, sau đó địn lượng saponin để xác định hệ số phân bố và năng suất thu hồi. Sau khi đã chọn được phương án tối ưu, lập lại điều kiện kiện tối ưu 3 lần nhằm kiểm tra sự tương thích giữa lý thuyết với thực nghiệm.

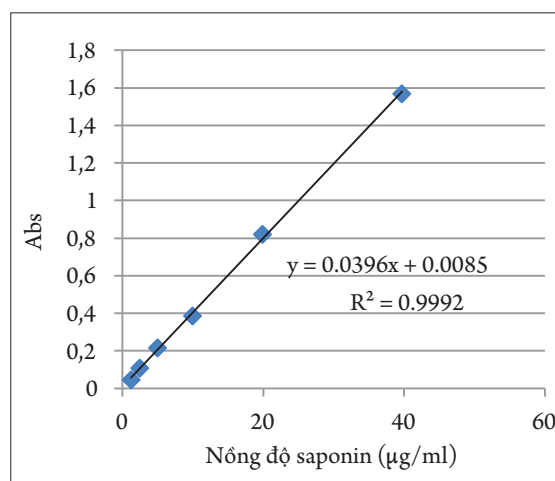
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Xây dựng và thẩm định phương pháp địn lượng bằng UV – Vis

Sau khi quét phổ thu xác định cực đại hấp thụ tại $\lambda = 550 \text{ nm}$, phương trình tuyến tính là $Y = 0.039569 X + 0.0085$ ($R^2=0.9992$), trong đó: Y: Độ hấp thụ; X: Nồng độ saponin ($\mu\text{g/ml}$). Sau khi thẩm định phương pháp đạt tiêu chuẩn AOAC. Kết quả thể hiện trong hình 1 và 2.



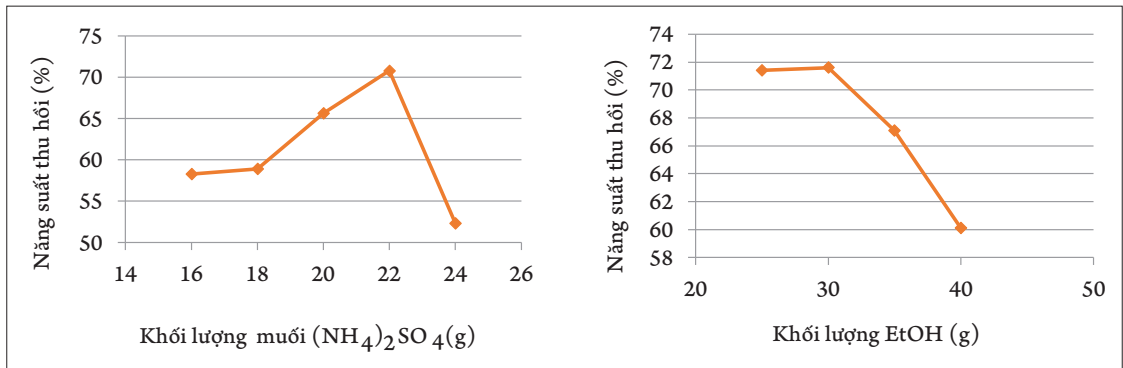
Hình 1. Phổ hấp thụ cực đại của chất chuẩn acid oleanolic



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ acid oleanolic tại 550 nm

Khảo sát đon yếu tố ảnh hưởng đến hệ dung môi cồn muối

Sau khi tiến hành khảo sát cho thấy nhiệt độ không ảnh hưởng nhiều đến hệ dung môi. Vì vậy 3 yếu tố ảnh hưởng nhất được đem tối ưu là: Khối lượng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, khối lượng EtOH và khối lượng nước. Kết quả thể hiện hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng đơn yếu tố đến hệ dung môi cồn muối

Tối ưu hóa hệ dung môi cồn muối

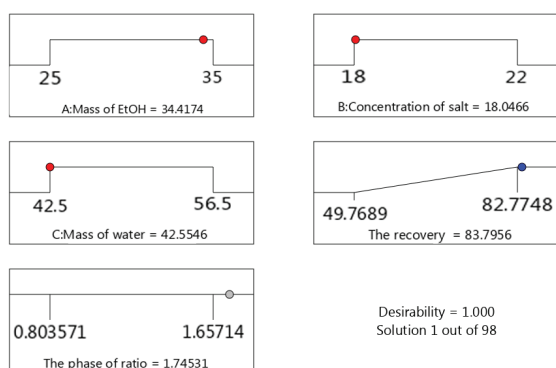
Thí nghiệm được thực hiện theo bảng 2. Sử dụng phần mềm Design Expert 11.0 để thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa và xử lý số liệu thống kê. Kết quả mô tả trong hình 4.

Bảng 1. Bảng yếu tố và mức giá trị dung nghiên cứu R trong BBD

Mã hoá	Biến	Đơn vị	Low value (-1)	Centre value (0)	High value (1)
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	g	18	20	22
B	EtOH	g	25	30	35
C	H ₂ O	g	42.5	49.5	56.5

Bảng 2. Bảng thiết kế thí nghiệm hệ dung môi cồn muối

Run	A	B	C	R	Run	A	B	C	R
	g	g	g	%		g	g	g	%
1	25	22	49.5	77.8369	9	30	22	56.5	65.6221
2	30	18	56.5	49.7689	10	35	18	49.5	64.8425
3	25	20	56.5	65.1023	11	30	20	49.5	80.1759
4	25	18	49.5	62.7633	12	30	18	42.5	82.7748
5	30	20	49.5	70.0402	13	35	20	42.5	76.9325
6	35	20	56.5	67.7012	14	30	22	42.5	70.9242
7	30	20	49.5	66.6617	15	30	20	49.5	69.8793
8	30	20	49.5	69.5205	16	35	22	49.5	65.6996
					17	25	20	42.5	70.9242



Hình 4. Điều kiện hệ dung môi tối ưu bằng RSM

Kết quả cho thấy tại điều kiện: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18g, EtOH 34.4g và nước 42.5g cho năng suất thu hồi cao nhất lên tới 82.77%. Phân tích ANOVA cũng cho thấy rằng năng suất thu hồi R là giá trị đáng tin cậy vì có giá trị $p = 0.0303 < 0.05$.

Tiến hành làm giàu saponin từ gừng tât bằng hệ dung môi cồn muối đã được tối ưu kết quả thu được hàm lượng saponin trong cao lên tới 15.5%.

Thu hồi thành phần tạo pha

Pha trên được tách ra, đem cô quay thu được dung môi thu hồi là EtOH. Pha dưới đem tủa cồn tuyệt đối với các tỷ lệ $H = V_{\text{cồn}}/V_{\text{pha dưới}}$ từ 2 – 10 lần. Kết quả cho thấy tại $H = 6$ cho hiệu suất thu hồi muối lớn nhất đạt khoảng 94%.

KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy ATPS hiệu quả trong việc làm giàu saponin từ gừng tât. Tại điều kiện tối ưu gồm khối lượng EtOH 34.4g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18g và khối lượng nước 42.5g, saponin tập trung chủ yếu tại lớp trên của hai pha với khả năng thu hồi lên tới 83.79%. Áp dụng điều kiện này, cao gừng tât ban đầu với hàm lượng saponin 7.5% được tinh chế tăng gấp đôi 15.5% (g/g). Trong khi đó, hàm lượng saponin trong cao khi áp dụng phương pháp cổ điển hai pha không đồng tan n-butanol/ H_2O chỉ khoảng 13.3%. Phương pháp này cho thấy hiệu quả cao trong việc làm giàu saponin, dễ nâng cấp quy mô, và dung môi thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Bá (2007), *Giáo trình Thực Vật học Giáo dục*, Hà Nội.
2. Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Khoa học và công nghệ, Hà Nội.
3. Ngô Xuân Thu (2004), "Dược liệu", Trường đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
4. Hoàng Thị Huyền Trang (2017), *Ứng dụng nhựa macroporous trong làm giàu saponin từ rễ gừng tât (Achyranthes bidentata Blume)*, Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.

Tiếng Anh

5. Yonggjian Yi Chaoyun Wang Zhijian Tan, et al (2014), "Extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) leaf using an ethanol/salt aqueous two-phase system", *Separation and Purification Technology*. 132, tr. 396-400.
6. Mukhopadhyay S. Khuri A. I. (2010), "Response surface methodology", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2(2), tr. 128-149.
7. Yun Wang Juan Han Yu Liu, et al (2013), "Selective separation of flavones and sugars from honeysuckle by alcohol/salt aqueous two-phase system and optimization of extraction process", *Separation and Purification Technology*. 118, tr. 776-783.
8. Tang W (1992), *Chinese Drugs of Plant Origin*.