

NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH FERULIC ACID TỪ RỄ CÂY ĐƯƠNG QUY (*RADIX ANGELICAE SINESIS*) Ở HUYỆN NAM TRÀ MY, TỈNH QUẢNG NAM

NGUYỄN THỊ ANH NGUYỆT, BÙI XUÂN VƯỢNG -
Khoa Hoá, Đại học Sư phạm Đà Nẵng, Đại học Đà Nẵng

SUMMARY:

A STUDY ON THE EXTRACTION OF FERULIC ACID FROM DANGGUI ROOT
(*RADIX ANGELICAE SINESIS*) AT SOUTHERN TRA MY DISTRICT,
QUANG NAM PROVINCE

This paper presents a study on the extraction of ferulic acid (FA) from Danggui root (*Radix Angelicae Sinensis*) collected in the southern Tra My district, Quang Nam province by a method of immersion combined with sonication. The experimental results show that the suitable extraction condition is the temperature of 30°C, the solid sample-extraction solvent of 50g/200ml of the NaOH/Methanol/H₂O extraction solvent of NaOH 0.7% (w/v) and pure MeOH (30:70 v/v), the immersion time of 60 min and then the sonication time of 30 min. As a result, the content of FA in the Danggui root analysed by HPLC is 0.92mg/g dry sample. This value is rather high, compared with other Dangguis, shows that this Danggui has rather good quality.

Key words: extraction, sonication, immersion, ferulic acid, Dangguis, marker compound, HPLC.

I. MỞ ĐẦU

Đương Quy (*Radix Angelicae Sinensis*) là một trong những vị thuốc của y học cổ truyền dùng chữa bệnh phụ nữ, được đưa vào Dược Điển Việt Nam từ 1983 đến nay, có tác dụng chữa bệnh thiếu máu và cùng hiệu quả[1]. Đặc biệt, rễ cây Đương Quy được dùng trong việc điều trị, kiểm soát, phòng chống và cải thiện những bệnh, hội chứng và triệu chứng như: stress, ung thư, bệnh tiểu đường, rối loạn tim mạch, rối loạn thoái hóa thần kinh. Các nghiên cứu gần đây cho thấy những cấu tử chính có liên quan đến hoạt tính sinh học và những đặc tính dược liệu của Đương Quy gồm các hợp chất phthalide, các acid hữu cơ và các ester của chúng, các polysaccharide[2]. Trong số các acid hữu cơ, ferulic acid mặc dù có cấu tạo phân tử khá đơn giản nhưng lại có hàm lượng lớn và có hoạt tính sinh học rất cao[3, 4, 7]. Do đó, ferulic acid được sử

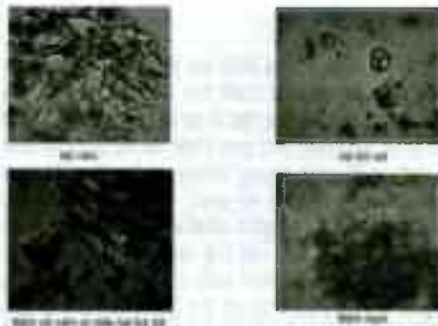
dụng rộng rãi làm chất đánh dấu (marker compound) để đánh giá chất lượng của Đương Quy và các sản phẩm của nó [6, 7]. Ferulic acid được chiết tách từ rễ Đương Quy bằng nhiều phương pháp như chiết soxhlet bằng hệ dung môi methanol-formic acid (95:5)[8], chiết hồi lưu dung môi methanol 70%[9] hay dung môi ethanol[10], chiết trợ giúp vi sóng với dung môi ethanol 90%[5] hay chiết siêu âm bằng dung môi ethanol 70%[11]. Trong báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu chiết tách ferulic acid thô trong rễ Đương Quy (Nam Trà My, Tỉnh Quảng Nam) bằng phương pháp ngâm chiết với dung môi thích hợp kết hợp lắc siêu âm, đồng thời định lượng ferulic acid trong dịch chiết đương quy bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Rễ cây Đương Quy, được lựa chọn một cách ngẫu nhiên ở huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Rễ cây Đương Quy mang về được phơi khô, cắt, xay nhỏ và được rây qua rây có kích thước lỗ cỡ 0,5mm, bảo quản trong bình kín ở nhiệt độ 4°C. Bột vừa chuẩn bị được đem soi bột để giám

định loài thực vật. Kết quả soi bột được trình bày trong Hình 1 cho thấy có nhiều hạt tinh bột đứng riêng lẻ, các mảnh mô mềm chứa nhiều hạt tinh bột đứng riêng lẻ và mảnh mạch. Điều này minh chứng đây đúng là Đương Quy (*Radix Angelicae Sinensis*) theo tính chất soi bột trong Dược Điển Việt Nam V[1].



Hình 1. Kết quả soi bột giám định thực vật của FA

2. Hóa chất và thiết bị

Chuẩn FA (tinh khiết >98%), các dung môi acetonitril, methanol, ethanol, ete dầu hỏa và các hóa chất như NaOH, KH_2PO_4 sử dụng trong các thí nghiệm là hóa chất tinh khiết phân tích của hãng Merck (Germany).

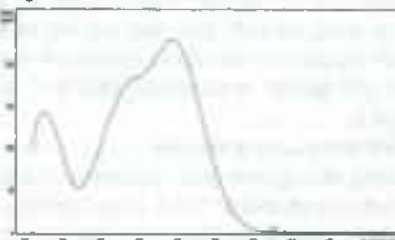
Dung môi NaOH/methanol/ H_2O được pha bằng cách cân 2 gam NaOH rắn hòa tan trong 300ml nước cất 2 lần rồi thêm 700ml methanol tinh khiết vào.

Chiết siêu âm được thực hiện trên máy GTSONIC (China). Các phép đo UV-VIS khi khảo sát điều kiện chiết tối ưu được thực hiện trên máy UV-1800 của hãng Shimadzu (Japan). Định lượng FA trong dịch chiết bằng máy HPLC của hãng Agilent 1260 (USA) được trang bị cột Eclipse plus C18(4,6cm x 250mm x 5 μ m), đầu dò DAD (Diode-Array Detector).

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết FA

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết ferulic acid ở rễ cây Dương Quy được chọn để khảo sát là dung môi chiết, thời gian ngâm chiết, nhiệt độ chiết và tỉ lệ rắn lỏng. Các dung dịch chiết ở mỗi trường hợp khảo sát được ghi phổ UV trong khoảng bước sóng 300 – 410nm để theo dõi giá trị độ hấp thụ quanh bước sóng khoảng 320nm do phổ UV-VIS của FA có cực đại hấp thụ ở 321nm như được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Phổ UV-VIS của FA chuẩn

3.2. Định lượng FA trong dịch chiết bằng HPLC

Việc định lượng FA trong dịch chiết được thực hiện bằng phương pháp chuẩn ngoại (external standard method) với điều kiện tiến hành sắc ký HPLC như sau: Pha động là dung dịch hỗn hợp đệm dihydrophosphat 10mM/L pH 4,0 và acetonitril với tỉ lệ 80:20 (v/v) không đổi trong suốt quá trình rửa giải với tốc độ dòng 1,2ml/phút, bước sóng dò tìm 321nm, nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 20 μ l.

Dung dịch chuẩn được chuẩn bị như sau: Cân chính xác khoảng 10mg ferulic acid chuẩn cho vào bình định mức 10ml, thêm khoảng 7ml methanol, siêu âm, bổ sung vừa đủ bằng methanol, thu được dung dịch chuẩn gốc ferulic acid có nồng độ chính xác khoảng 1.000 μ g/ml. Từ các dung dịch chuẩn gốc trên, tiến hành pha loãng bằng methanol để thu được các dung dịch dùng để xây dựng đường chuẩn có nồng độ lần lượt là 5 μ g/ml; 10 μ g/ml; 15 μ g/ml; 20 μ g/ml; 25 μ g/ml. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn. Ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic của ferulic acid và từ đó xác định phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ của FA.

Nồng độ của FA trong dịch chiết được xác định dựa trên công thức (1):

$$C(\mu\text{g/ml}) = \frac{S - b}{a} \quad (1)$$

Ở đây S là diện tích pic của FA; a là độ dốc, b giao điểm đường chuẩn với trục tung của phương trình tuyến tính:

$$S = aC + b.$$

Dung dịch mẫu thử tiêm vào máy HPLC được chuẩn bị như sau: 50g bột rễ cây Dương quy được chiết theo điều kiện tối ưu đã khảo sát ở trên, lọc dịch chiết đem cô quay thu được cặn rồi hoà tan trong 200ml methanol. Lọc qua giấy lọc, pha loãng (nếu cần) rồi lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 μ m trước khi tiêm vào máy HPLC.

Hàm lượng FA trong dược liệu được xác định dựa trên công thức (2):

$$X(\text{mg/g}) = \frac{C \times 200 \times 100 \times P}{m \times 1000 \times (100 - B)} \quad (2)$$

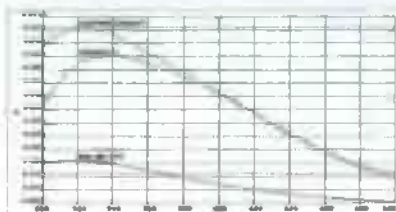
Ở đây X là nồng độ ppm tức số mg FA chứa trong 1 gam dược liệu; m là khối lượng dược liệu (gam); B (%) là độ ẩm của mẫu thử đem phân tích (B = 5,933%); P là độ tinh khiết của chất chuẩn FA; 200 là số ml dung môi chiết.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết ferulic acid ở rễ cây Đương Quy

1.1. Ảnh hưởng của dung môi chiết

Cân 50g bột rễ Đương Quy đã được sấy khô kiệt cho vào các bình nón 250ml lần lượt chứa 200ml các dung môi (1) NaOH/methanol/H₂O, (2) ethanol/H₂O 70% (v/v), (3) ẽtê dầu hỏa ngâm trong thời gian 60 phút, sau đó lắc siêu âm trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, lọc lấy dịch chiết rồi pha loãng dung dịch 10 lần và đem đo UV – VIS. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của dung môi đến khả năng chiết FA được biểu diễn ở Hình 3.

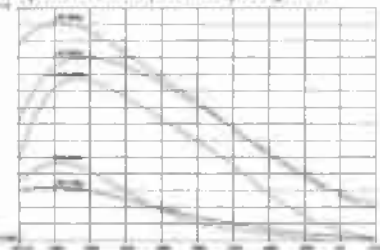


Hình 3. Ảnh hưởng của dung môi chiết đến quá trình chiết FA

Đồ thị Hình 3 cho thấy khi thay đổi dung môi chiết thì độ hấp thụ A của FA trong các trường hợp dung môi đều cho kết quả cao nhất trong khoảng bước sóng từ 310 – 330nm chứa bước sóng hấp thụ cực đại của ferulic acid (321nm)[12]. Ở đây độ hấp thụ A đạt được cao nhất ở bước sóng khoảng 320nm cho trường hợp dùng dung môi chiết NaOH/methanol/H₂O. Điều này có thể giải thích như sau: Trong ba dung môi chiết trên thì dung môi chiết NaOH/methanol/H₂O có độ phân cực cao nhất. NaOH trong dung môi chiết này trung hòa chuyển nhóm -COOH thành nhóm mang điện tích -COO⁻ làm tăng độ hòa tan của FA vào dung môi chiết này so với hai dung môi chiết kia. Vì vậy dung môi NaOH/methanol/H₂O được chọn để khảo sát tiếp.

1.2. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết

Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến quá trình chiết FA được tiến hành giống mục 3.1.1, nhưng ở đây sử dụng dung môi NaOH /methanol/H₂O, thời gian ngâm chiết thay đổi 15, 30, 45, 60, 90 (phút) và sau đó các mẫu được đem lắc siêu âm trong 30 phút. Kết quả khảo sát được trình bày trong Hình 4.

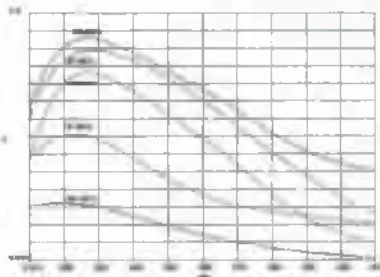


Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến quá trình chiết FA

Kết quả từ Hình 4 cho thấy khi tăng thời gian ngâm chiết thì khối lượng chất chiết thu được cũng tăng lên thể hiện thông qua độ hấp thụ A và đạt kết quả cao nhất sau 60 phút. Nếu tăng thời gian chiết lên 90 phút thì khối lượng chất chiết giảm nhưng không nhiều nên thời gian chiết tối ưu được chọn là 60 phút. Điều này có thể giải thích do tăng thời gian ngâm chiết sẽ giúp dung môi có thời gian thẩm thấu vào các mô mạch các tế bào thực vật để hòa tan FA nên hiệu suất chiết tăng lên, nhưng việc ngâm lâu đến 90 phút có thể làm cho FA hấp phụ một phần lên bề mặt của các sợi xenulose của rễ đương quy dẫn đến độ hấp thụ giảm xuống nhưng không nhiều.

1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến quá trình chiết FA được khảo sát với thời gian ngâm chiết 60 phút và thông số nhiệt độ chiết được thay đổi từ 15 đến 60°C.

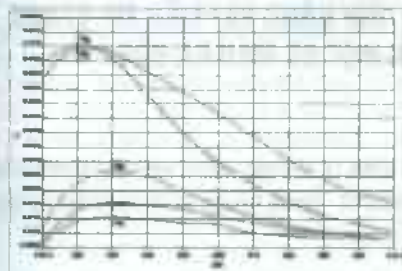


Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến quá trình chiết FA

Từ Hình 5 cho thấy khi tăng nhiệt độ chiết từ 15°C lên 30°C thì khối lượng chất chiết thu được cũng tăng lên rất mạnh. Ở nhiệt độ chiết 30°C và 40°C ta thấy khối lượng chất chiết thu được không chênh lệch nhau nhiều, nhưng ở 50°C khối lượng chất chiết thu được giảm đi khá nhiều và giảm mạnh khi nhiệt độ chiết ở 60°C. Sự gia tăng nhiệt độ chiết làm giảm hiệu suất chiết FA (thể hiện qua độ hấp thụ), đặc biệt giảm mạnh ở 60°C có thể được giải thích khi nhiệt độ chiết tăng lên làm methanol bay hơi càng nhiều (nhiệt độ sôi của methanol là 64,7°C) làm thành phần dung môi chiết giảm dung môi hữu cơ nên tăng mạnh tính phân cực dẫn đến độ hòa tan của FA vào dung môi chiết giảm đi. Vì vậy nhiệt độ chiết tối ưu được chọn là 30°C.

1.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ rắn/lỏng

Ảnh hưởng của tỉ lệ rắn/lỏng đến quá trình chiết FA được khảo sát với nhiệt độ chiết 30°C và tỉ lệ rắn/lỏng được cố định thể tích dung môi V = 200ml, còn khối lượng mẫu rễ Đương Quy là 10, 15, 20, 25, 50 và 75 (gam).

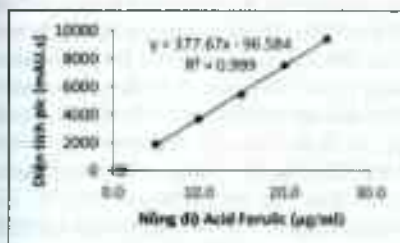


Hình 6. Ảnh hưởng của tỉ lệ rắn lỏng đến quá trình chiết FA

Hình 6 cho thấy khi khối lượng mẫu rắn tăng lên trong cùng thể tích dung môi chiết 200 ml thì khối lượng chất chiết được cũng tăng lên theo. Tuy nhiên lượng chất chiết FA ở 50g và 75g mẫu thu được gần bằng nhau thể hiện qua độ hấp thụ gần bằng nhau ở bước sóng khoảng 320 nm. Điều này cho thấy ở 50 gam mẫu rắn FA chiết được gần như đạt được bão hòa trong dung môi chiết. Do đó, chúng tôi chọn tỉ lệ rắn/lỏng là 50g/200ml.

2. Xác định hàm lượng FA trong dịch chiết bằng HPLC

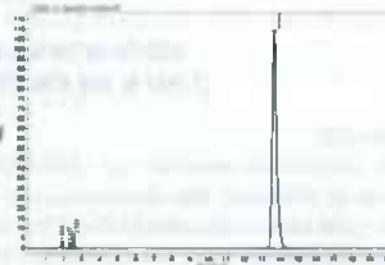
Kết quả xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ FA ($\mu\text{g/ml}$) với diện tích (mAU.s) của pic FA trên sắc ký đồ được trình bày trong Hình 7.



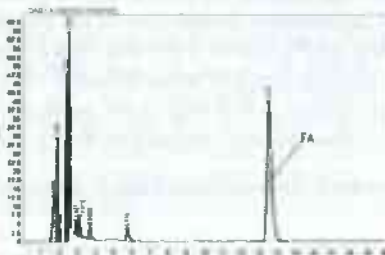
Hình 7. Đường chuẩn tuyến tính giữa nồng độ FA và diện tích pic FA

Phương trình hồi quy có hệ số tương quan $R^2 = 0,999$ cho thấy mức độ tuyến tính cao của mối quan hệ giữa diện tích pic FA với nồng độ của FA khi tiến hành chạy sắc ký HPLC. Hình 8 và 9 trình bày sắc ký đồ tiêu biểu của dung dịch chuẩn FA và sắc ký đồ của dung dịch mẫu chiết từ rễ Dương Quy ở điều kiện phù hợp đã chọn. Kết quả tính toán dựa vào đường chuẩn và diện tích pic của FA trong sắc ký đồ của dung dịch chiết cho nồng độ FA trong dịch chiết là $2,16\mu\text{g/ml}$ và sử dụng công thức (2) để tính được hàm

lượng ferulic acid trong Dương Quy ở Nam Trà My (Quảng Nam) là $0,92\text{mg/g}$ mẫu khô. Kết quả này là khá cao so với hàm lượng FA của Dương Quy nước ngoài đã công bố dao động trong khoảng từ $0,211$ đến $1,75\text{mg/g}$ mẫu khô[2].



Hình 8. Sắc ký đồ HPLC của dung dịch chuẩn FA



Hình 9. Sắc ký đồ HPLC dịch chiết của rễ cây Dương Quy

IV. KẾT LUẬN

Quy trình chiết tách ferulic acid ở rễ cây Dương Quy bằng phương pháp ngâm chiết bằng dung môi NaOH/Methanol/ H_2O kết hợp iắc siêu âm đã được khảo sát cho điều kiện chiết phù hợp là thời gian ngâm chiết 60 phút kết hợp với 30 phút iắc siêu âm, nhiệt độ chiết 30°C , tỉ lệ rắn/lỏng là 50g/200ml. Kết quả phân tích dịch chiết từ rễ cây Dương Quy từ huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam bằng phương pháp HPLC cho hàm lượng của FA là $0,92\text{mg/g}$ mẫu khô. Kết quả này khá cao so với hàm lượng của một số loại Dương Quy khác cho thấy chất lượng khá tốt của loại Dương Quy này đồng thời cũng cho thấy quy trình chiết tách này có hiệu lực cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y Tế (2017), *Dược Điển Việt Nam V*, NXB Y học, Hà Nội, tr 1173.
- [2]. L. Yi, Y. Liang, H. Wu, D. Yuan (2009), *The analysis of Radix Angelicae Sinensis (Danggui)*. Journal of Chromatography A, 1216, 1991–2001.

(Xem tiếp trang 75)

NGHIÊN CỨU CHIẾT TÁCH FERULIC ACID TỪ RỄ CÂY ĐƯƠNG QUY...

(Tiếp theo trang 67)

- [3] R. Upton (2003), *American Herbal Pharmacopoeia and therapeutic compendium: Dang Gui Root-Angelica sinensis*. (Oliv.), Diels Scotts Valley, CA.
- [4] K.J. Zhao, T.T.X. Dong, P.F. Tu, Z.H. Song, C.K. Lo, K.W.K. Tsim (2003), *Molecular genetic and chemical assessment of radix Angelica (Danggui) in China*. J. Agric. Food Chem. 51,2576.
- [5] G. X. Hua, X. Gong, C. X. Bao (2007), *Study on the extraction and purification of ferulic acid in Angelica sinensis*, Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities 21(6):1008-1012
- [6] G.H. Lu, K. Chan, K. Leung, C.L. Chan, Z.Z. Zhao, Z.H. Jiang (2005), *Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese Angelica from related umbelliferae herbs*. J. Chromatogr. A Volume 1073, 383-392.
- [7] W. W. Chao, B. F. Lin (2011), *Bioactivities of major constituents isolated from Angelica sinensis (Danggui)*, Chinese Medicine, 6:29
- [8] N. Xin, X.E. Luo, Y. Mo (2001), *Comparison of ferulic acid contents in different grades of Radix Angelicae*, J. Chin. Med. Mater. 24, 244-245.
- [9] W.Y. Huang, S.J. Sheu (2006), *Separation and identification of the organic acids in Angelicae Radix and Ligustici Rhizoma by HPLC and CE*, J. Sep. Sci. 29, 2616
- [10] S.J. Sheu, Y.S. Ho, Y.P. Chen, H.Y. Hsu (1987), *Analysis and Processing of Chinese Herbal Drugs: VI. The Study of Angelicae Radix*, Planta Med. 53, 377.
- [11] S. Y. Jeong, H. M. Kim, K. H. Lee, K. Y. Kim, D. S. Huang, J. H. K., R. S. S. (2015) *Quantitative Analysis of Marker Compounds in Angelica gigas, Angelica sinensis, and Angelica acutiloba by HPLC/DAD*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, volume 63, No.7, pp. 504-511.
- [12] G.X. Pan, C.I. Thomson, G. Leary, (2007). *UV-VIS spectroscopic characteristics of ferulic acid and related compounds*, J. o. wood chemistry and technology, volume 22, 2002, p. 137-146. ❖

Phản biện: TS BÙI THỊ THÚY LUYỆN