



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003807

(51) **A61K 36/80**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00323

(22) 25/07/2022

(45) 25/11/2024 440

(43) 26/09/2022 414

(73) Viện Dược liệu (VN)

3B Quang Trung, Trảng Tiền, Hoàn Kiếm, Hà Nội

(72) Hoàng Đức Mạnh (VN); Đào Anh Hoàng (VN).

(54) **QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO KHÔ RAU ĐẮNG BIỂN (BACOPA
MONNIERI)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển bao gồm các bước: xử lý sơ bộ rau đắng biển; chiết rau đắng biển bằng phương pháp chiết nóng với dung môi etanol 70%; cô dung dịch chiết đến cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 20 - 30% để thu hồi etanol; loại tạp bằng cách khuấy cao khô thu được trong dung môi metanol, hỗn hợp được để lắng trong 12 - 24 giờ và thu lấy phần dung dịch; cô dung dịch chiết thu được đến cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 40 - 50% để thu hồi metanol; loại tạp bằng cách phân tán đều cao khô thu được trong dung môi axeton, hỗn hợp được để lắng trong 12 - 24 giờ và thu lấy phần lắng; sấy chân không phần lắng thu được ở bước trên để thu được cao khô rau đắng biển tinh chế.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) để sử dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến trí nhớ và thần kinh.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây rau đắng biển còn có tên gọi khác là sam trắng, có tên khoa học là *Bacopa monnieri* L. họ hoa mõm chó *Scrophulariaceae*. Từ lâu, cây này rất phổ biến trong đời sống được dùng làm rau ăn ở các vùng nông thôn, đặc biệt loài thực vật này đã được biết đến ở Ấn Độ hơn 3000 năm trước và được coi như một vị thánh (Brahma) trong việc kích thích bảo vệ trí nhớ và được sử dụng như một loại thuốc bổ thần kinh và tăng cường nhận thức và đang được nghiên cứu theo hướng để bảo vệ thần kinh. Đây là cây mọc phổ biến ở Việt Nam với tiềm năng lớn để phát triển thành sản phẩm thương mại. Hiện nay, nhu cầu sử dụng rau đắng biển và nhu cầu sử dụng cao chiết từ dược liệu này ngày càng tăng cao. Rau đắng biển được sử dụng rất phong phú trong các chế phẩm: có thể sử dụng độc lập hoặc phối hợp với một số dược liệu và một số vi khoáng nhằm hỗ trợ điều trị một số đối tượng có các biểu hiện hay quên, lơ đãng, giảm trí nhớ, người bị sa sút trí tuệ, người bị Alzheimer, người lo âu, căng thẳng thần kinh, stress, suy nhược thần kinh, người thiếu năng tuần hoàn não và tuần hoàn ngoại biên, v.v.. Với tốc độ gia tăng ngày càng cao lượng bệnh nhân bị mắc bệnh sa sút trí tuệ, hay quên, căng thẳng, mất tập trung, thì việc nghiên cứu ứng dụng và phát triển chế phẩm từ cây rau đắng biển để hỗ trợ điều trị một số bệnh liên quan đến thần kinh và trí nhớ là điều thiết yếu và đáng được quan tâm hỗ trợ của các cơ quan có thẩm quyền và của toàn xã hội.

Có nhiều phương pháp chiết xuất cao rau đắng biển sử dụng các dung môi khác nhau như nước, etanol, metanol và hỗn hợp các dung môi. Trong công nghiệp, thông dụng nhất là sử dụng hỗn hợp của etanol và nước với các tỷ lệ khác nhau, các nồng độ etanol thường sử dụng là 95%; 80%; 50% để chiết xuất có hiệu suất chiết và hàm lượng bacosid tương đối cao có thể trên 20% bacosid toàn phần và có thể cao hơn.

Hàm lượng bacosid thường được đánh giá bằng nhiều phương pháp: phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo bacosid A (gồm 4 bacosid) hoặc bacosid A và bacopasid I hoặc định lượng bacosid toàn phần theo phương pháp UV. Theo Murthy và cộng sự (2006) đã xây dựng phương pháp định lượng bacosid bằng HPLC xác định hàm lượng của 12 bacopa saponin trong rau đắng biển của Ấn Độ. Kết quả cho thấy hàm lượng tổng của 12 saponin trong khoảng 5,1- 6% trong đó bacopasid I (0,6-0,7%) và bacosid A (bacosid A₃(1,7-2,6%), bacopasid II (0,8-1,5%), bacopasid X (1%) và bacopasaponin C (0,7%)) là những thành phần chiếm hàm lượng

lớn trong nhóm saponin. Dựa theo nghiên cứu này, dược điển Anh (2016) và Dược điển Mỹ (USP 35) cũng đánh giá hàm lượng “bacosid” thông qua tổng hàm lượng bacopasid I và bacosid A và tổng của chúng không được nhỏ hơn 2,5% tính theo cành và lá khô.

Bằng độc quyền sáng chế US6833143B1 đề cập đến quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển như sau: Với 1,0 kg dược liệu rau đắng biển trồng ở CIMAP được làm khô trong bóng râm ở 30°C trong 24 giờ và tiếp tục được sấy trong tủ sấy ở 42°C trong 8 giờ. Sau khi sấy khô, thu được 400g dược liệu có hàm ẩm là 4,5%. Dược liệu khô được đem đi xay và sàng qua rây với kích thước lỗ sàng 30 mesh. Sau đó dược liệu được cho vào túi lọc và chiết soxhlet với 2,5 lít *n*-hexan trong khoảng 5 giờ để loại chất béo và 1 phần chất màu có trong dược liệu. Sau quá trình chiết thu được dịch chiết hexan và bã dược liệu, dịch chiết *n*-hexan được đem cô thu hồi dung môi. Loại hết dung môi *n*-hexan còn dư trong bã dược liệu bằng cách cho bã dược liệu vào thiết bị chiết ở 70-75°C với tác nhân gia nhiệt là nước nóng. Sau đó bã dược liệu được lặp lại quá trình chiết tương tự như trên với 2,5 lít acetone. Sau đó bã dược liệu lại được chiết Soxhlet với 2,5 lít metanol, trong 6 giờ. Dịch chiết metanol sau đó được cô thu hồi dung môi ở áp suất giảm, thu được 100ml dịch sau cùng. Dịch chiết thu được, được cho từ từ vào một bình có chứa 400 ml acetone có khuấy để kết tủa bacosid cùng với một số chất không hòa tan khác. Tủa được lọc trong bộ lọc hút chân không Nutsche để loại bỏ dung môi. Chất kết tủa thu được được hòa tan trong 50 ml nước. Dung dịch này sau đó đem chiết với *n*-butanol (5 x 15 ml) chuyển bacosid sang pha dung môi *n*-butanol. Dịch chiết *n*-butanol được cô quay ở áp suất giảm ở nhiệt độ 50-55°C đến khi thu được khối lượng cao khô không đổi (9,8 g cao khô). Khối lượng cao khô được hòa với 100ml nước và 0,2 mg β -cyclodextrin trong thiết bị khuấy. Khuấy dung dịch thêm 1,5 giờ rồi cho dung dịch qua máy phun sấy với nhiệt độ dòng không khí từ 100-110°C thu được khoảng 7,8g sản phẩm dạng bột bóng, trơn chảy, với hàm lượng bacosid đạt 28% (phân tích sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao - HPLC), hiệu suất của toàn bộ quá trình là 1,95%.

Tuy nhiên, phương pháp chiết xuất cao khô rau đắng biển nêu trên còn có nhược điểm là sử dụng dung môi *n*-hexan, acetone và metanol cần 4 lần chiết và tỉ lệ dung môi – dược liệu lớn, nên khi áp dụng vào thực tế cần triển khai tối ưu lại điều kiện chiết xuất để giảm chi phí khi áp dụng vào thực tế ở Việt Nam. Ngoài ra, các dung môi này độc hại và có giá thành cao, do đó phương pháp này không tối ưu về mặt kinh tế.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Cụ thể là, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển bao gồm các bước:

Xử lý sơ bộ rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) để loại bỏ các tạp chất và bụi bẩn trước khi chiết;

Chiết rau đắng biển bằng phương pháp chiết nóng với dung môi etanol 70%, trong đó tỉ lệ thể tích dung môi etanol so với khối lượng rau đắng biển nằm trong khoảng từ 10:1 đến 12:1, nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C, bước chiết này được lặp lại 2 lần với tần suất 2 giờ/lần;

Cô dung dịch chiết đến cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 20 – 30% để thu hồi etanol;

Loại tạp bằng cách khuấy cao khô thu được trong dung môi metanol với tỉ lệ thể tích dung môi metanol so với khối lượng cao khô là 4:1, hỗn hợp được để lắng trong 12 – 24 giờ và thu lấy phần dung dịch;

Cô dung dịch chiết thu được đến cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 40 – 50% để thu hồi metanol;

Loại tạp bằng cách phân tán đều cao khô thu được trong dung môi axeton với tỉ lệ thể tích dung môi axeton so với khối lượng cao khô là 8:1, hỗn hợp được để lắng trong 12 – 24 giờ và thu lấy phần lắng;

Sấy chân không phần lắng thu được ở bước trên để thu được cao khô rau đắng biển tinh chế.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ khối quy trình thực hiện chiết xuất cao khô rau đắng biển theo phương án của giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển được mô tả chi tiết dưới đây.

Rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) sau khi thu hoạch có thể lẫn rất nhiều tạp chất như bụi bẩn, các sinh vật ký sinh, v.v., do đó trước khi tiến hành chiết, rau đắng biển cần được xử lý sơ bộ bằng cách rửa để loại bỏ hết các tạp chất này.

Sau khi xử lý sơ bộ, rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) được đem chiết bằng phương pháp chiết nóng với dung môi etanol. Tốt hơn là, nồng độ của dung môi etanol nằm trong khoảng 60 – 80%. Tốt nhất là, nồng độ của dung môi etanol là 70%. Tỉ lệ thể tích của dung môi etanol so với khối lượng rau đắng biển sử dụng trong bước chiết này nằm trong khoảng từ 10:1 đến 12:1, tốt hơn là tỉ lệ này là 12:1. Quá trình chiết nóng được thực hiện trong khoảng 70 – 80°C, tốt nhất là 75°C và quá trình này được gia nhiệt bằng hơi nóng của hơi nước. Tốt hơn là, quá trình chiết được lặp lại 2 lần với tần suất 2 giờ/lần.

Dịch chiết thu được được đem cô cạn đến khi thu được cao có hàm lượng chất rắn đạt 20 – 30%, với hàm lượng chất rắn trong cao được xác định bằng Brix kế, quá trình cô cạn này được thực hiện bằng thiết bị cô thu hồi giúp thu hồi etanol.

Cao khô có hàm lượng 20 – 30% chất rắn thu được được đem loại bỏ các tạp chất bằng phương pháp lắng trong dung môi metanol. Tỷ lệ thể tích của dung môi metanol so với khối lượng cao khô tối ưu nhất là 4:1. Hỗn hợp dung môi và cao khô này được khuấy đều và để lắng trong 12 – 24 giờ, tốt nhất là lắng qua đêm, sau đó thu lấy phần dung dịch. Phần lắng chính là các tạp chất cần loại bỏ. Phần dung dịch được đem cô cạn cho đến khi thu được cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 40 – 50%. Bước cô cạn này cũng được thực hiện bằng thiết bị cô thu hồi giúp thu hồi metanol.

Cao khô có hàm lượng chất rắn 40 – 50% thu được từ bước trên được đem phân tán đều vào dung môi axeton, với tỷ lệ thể tích của dung môi axeton so với khối lượng cao khô tối ưu nhất là 8:1, hỗn hợp này được để lắng trong 12 – 24 giờ, tốt nhất là lắng qua đêm, sau đó thu lấy phần lắng. Phần lắng sau đó được đem sấy để thu được cao khô rau đắng biển tinh chế, phương pháp sấy được sử dụng có thể là sấy chân không hoặc sấy phun đến khô, tốt hơn là sấy chân không.

Cao khô rau đắng biển thu được bởi quy trình theo giải pháp hữu ích được đem đánh giá hàm lượng bacosid trước khi đóng gói và đưa ra thị trường.

Phương pháp định lượng bacosid tổng số trong dược liệu và cao chiết

Lượng bacosid trong sản phẩm cao khô rau đắng biển thu được bởi phương pháp chiết xuất theo giải pháp hữu ích được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, với điều kiện sắc ký như sau:

Điều kiện sắc ký:

- + Cột: Zobax Eclip XDB C18 (250 x 4,6mm, 5 μ m)
- + Pha động (Gradient): ACN : đệm phosphat (từ KH₂PO₄ khan và H₃PO₄, pH = 2,3).
- + Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
- + Nhiệt độ cột: 27°C
- + Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L
- + Detector: UV (205 nm)

Tiến hành khảo sát một số chương trình gradient, kết quả thu được chương trình gradient như sau:

Bảng 1. Chương trình gradient HPLC

Thời gian (phút)	% Kênh A	% Kênh B
0 – 25	70	30
25 – 28	70 - 10	30 - 90
28 - 33	10	90
33 - 38	10 - 70	90 - 30
38 - 43	70	30

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10,00 mg bacosid A3 vào bình định mức 5 ml. Thêm 3 ml dung dịch metanol, lắc đều. Bổ sung bằng dung dịch trên đến vạch. Tiến hành pha loãng thu được dung dịch chuẩn bacosid A3 có nồng độ khoảng 0,5 mg/ml.

Dung dịch thử cao chiết: Cân chính xác khoảng 50,00 mg cao chiết, hòa tan trong dung môi thích hợp vừa đủ 10 ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 2,500 g dược liệu đã xay nhỏ vào bình nón có dung tích 100 ml. Thêm chính xác 25 ml dung dịch metanol. Chiết hồi lưu cách thủy trong 10 phút. Để nguội về nhiệt độ phòng và gạn lấy lớp dịch. Tiếp tục chiết đến khi dịch chiết mất màu. Gộp các dịch chiết, cô dưới áp suất giảm và định mức đến 100 ml bằng metanol. Lọc dịch thử qua màng lọc xenluloza axetat 0,45 µm thu được dịch sắc ký.

Định lượng mẫu thử

Tiêm riêng biệt các dung dịch mẫu thử, mỗi mẫu thử lặp lại 3 lần, ghi nhận sắc ký đồ và ghi lại đáp ứng của chất cần phân tích.

Nồng độ của chất cần phân tích trong dung dịch thử được xác định dựa trên công thức:

$$C (\mu\text{g/ml}) = \frac{S-b}{a} \times \frac{H}{100}$$

Với S là diện tích pic chất cần phân tích, a,b là các hệ số của phương trình đường chuẩn, H là độ tinh khiết của chất đối chiếu (%).

Hàm lượng chất phân tích trong dược liệu/cao chiết được xác định dựa trên công thức:

$$X (\%) = \frac{C \times k}{m \times 10} \times \frac{100}{100-x}$$

Trong đó:

X: hàm lượng chất cần phân tích trong dược liệu/cao chiết (%)

C: nồng độ chất cần phân tích trong dung dịch thử (µg/ml)

m: khối lượng dược liệu/cao chiết (g)

x: độ ẩm dược liệu/cao chiết (%)

k: hệ số quy đổi từng chất (Theo Dược điển Mỹ, hệ số F bằng 1,00 (bacosid A3), 1,03 (bacopasid I), 0,81 (bacopasid II), 0,99 (jujubogenin) và 0,75 (bacopasaponin C).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Khảo sát tỉ lệ dung môi/dược liệu

Tiến hành chiết xuất với các thông số cụ thể như sau:

- + Phương pháp: Chiết nóng
- + Nhiệt độ: 75°C
- + Tỉ lệ dung môi/dược liệu: 12/1
- + Thời gian: 2h/lần x 2 lần
- + Thời gian đảo dịch: 30 phút/lần
- + Dung môi: etanol 70%
- + Rửa dược liệu trước khi tiến hành chiết

Bảng 2. Kết quả khảo sát tỉ lệ chiết xuất

Tỷ lệ dung môi/dược liệu	Klg dược liệu (kg)	Khối lượng cao khô thu được (kg)	Hàm lượng bacosid (%)	Hiệu suất chiết bacosid	Etanol sử dụng (lit) tính theo etanol 96	Etanol thu hồi (lit) tính theo etanol 96
12/1	205	30,8	10,3	67,6%	3080	2300
	200	31,35	10,1	69,1%	3080	2260

	203	30,25	10,4	67,7%	3080	2280
	Trung bình	30,8±0,6	10,3±0,2	68,1%±0,8		2280

Khi nâng cấp quy mô 200kg/mẻ, hiệu suất chiết bacosid tổng số với tỷ lệ dung môi/dược liệu lần lượt là 12/1 thu được là 68,2%. Trong quy trình chiết 200kg/mẻ ở nồi chiết 3000L có thực hiện đảo dịch để tăng độ đồng đều gia nhiệt cũng như tăng độ hòa tan của các chất trong dược liệu.

Ví dụ 2: Đánh giá hiệu suất quá trình loại tạp

Cho 30kg cao lỏng cho vào thùng chiết có cánh khuấy, dung tích 1000 lít, sau đó thêm metanol (4 lần thể tích dung môi theo khối lượng cao toàn phần), khuấy đều, để lắng qua đêm. Thu dịch, cô thu hồi dung môi đến cao có hàm lượng chất rắn 40-50% (xác định bằng Brix kế), phân tán đều cao trong axeton (8 lần thể tích dung môi theo khối lượng cao). Để lắng qua đêm, lọc thu phần tủa. Sấy chân không đến khô thu được cao tinh chế. Kết quả nghiên cứu được thể hiện dưới bảng sau:

Bảng 3. Kết quả khảo sát phương pháp loại tạp

Khối lượng cao lỏng	Dung môi metanol (lit)	Tạp loại bằng Metanol (kg)	Dung môi acetone (lit)	Cao tinh chế (kg)	Hàm lượng bacosid tổng (%)	Hiệu suất tinh chế bacosid
30	120	3,3	240	2,95	22,15	84,6%
30	120	3,45	240	3,0	22,1	85,3%
30	120	3,42	240	2,90	22,4	84,1%
Trung bình		3,39±0,08		2,95±0,05	22,22±0,16	84,6%±0,60%

Cao thành phẩm thu được có hàm lượng bacosid tổng số là 22,22%, hiệu suất tinh chế là 84,6%, hiệu suất chiết của cả quá trình là khoảng 5%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết xuất cao khô rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) bao gồm các bước:

xử lý sơ bộ rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) để loại bỏ các tạp chất và bụi bẩn trước khi chiết;

chiết rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) bằng phương pháp chiết nóng với dung môi etanol 70%, trong đó tỉ lệ thể tích dung môi etanol so với khối lượng rau đắng biển nằm trong khoảng từ 10:1 đến 12:1, nhiệt độ chiết nằm trong khoảng từ 70 đến 80°C, bước chiết này được lặp lại 2 lần với tần suất 2 giờ/lần;

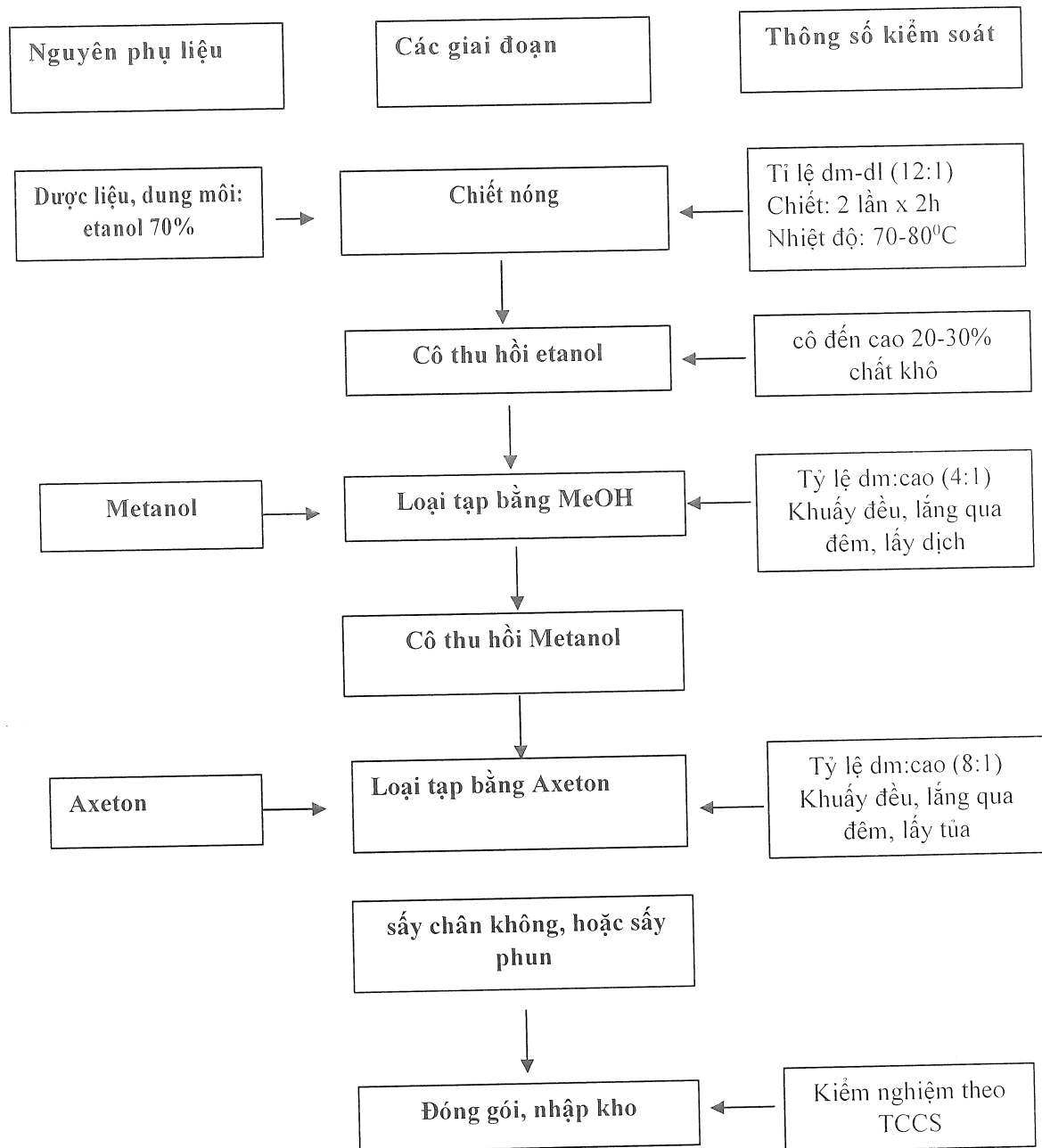
cô dung dịch chiết đến khi thu được cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 20 – 30% để thu hồi etanol;

loại tạp bằng cách khuấy cao khô thu được trong dung môi metanol với tỉ lệ thể tích dung môi metanol so với khối lượng cao khô là 4:1, hỗn hợp được để lắng trong 12 – 24 giờ và thu lấy phần dung dịch;

cô dung dịch chiết thu được đến khi thu được cao có hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng từ 40 – 50% để thu hồi metanol;

loại tạp bằng cách phân tán đều cao khô thu được trong dung môi axeton với tỉ lệ thể tích dung môi axeton so với khối lượng cao khô là 8:1, hỗn hợp được để lắng trong 12 – 24 giờ và thu lấy phần lắng;

sấy chân không phần lắng thu được ở bước trên để thu được cao khô rau đắng biển tinh chế.



Hình 1.