

## **Xây dựng quy trình chiết xuất và phân lập hesperidin từ dược liệu trần bì đủ điều kiện để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn**

**Vũ Thị Thanh An<sup>1\*</sup>, Cao Công Khánh<sup>1</sup>, Mạc Thị Thanh Hoa<sup>1</sup>,  
Trần Hùng Sơn<sup>1</sup>, Đỗ Thị Thanh Thủy<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

<sup>2</sup>*Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

*(Ngày đến tòa soạn: 26/02/2022; Ngày chấp nhận đăng: 30/03/2022)*

### **Tóm tắt**

Hesperidin là hoạt chất chính thuộc nhóm flavonoid chiếm khoảng 3 % trong dược liệu trần bì. Theo các nghiên cứu đã chỉ ra, hesperidin có tác dụng trong việc chống oxy hóa, giảm đau và kháng viêm trên hệ thần kinh cũng như tăng cường sức đề kháng cho cơ thể. Dược liệu trần bì là một dược liệu đơn giản, dễ kiếm và dễ sử dụng cho tiềm năng chiết xuất và phân lập hesperidin với hiệu suất cao. Nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình xác định hàm lượng hesperidin trên nền mẫu dược liệu và nguyên liệu bằng HPLC. Nghiên cứu đã thành công trong việc hoạt chất hesperidin với độ tinh khiết > 95 % (HPLC) đủ làm điều kiện để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Quy trình chiết xuất và phân lập sử dụng dung môi chiết ethanol 70 % với phương pháp chiết là đun hồi lưu sau đó làm sạch với than hoạt tính và được tinh chế trên thiết bị sắc ký điều chế thu được hiệu suất thu hồi lớn, quy trình đơn giản và đảm bảo tính kinh tế.

**Từ khóa:** *Hesperidin, chiết xuất, phân lập, trần bì.*

### **I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Việt Nam được biết đến là quốc gia có số lượng các loại dược liệu lên đến trên 5000 loài cây và nấm có tác dụng chữa bệnh được biết đến nhưng số lượng chất chuẩn, hoạt chất phân lập được từ các loại dược liệu để phục vụ công tác nghiên cứu cũng như kiểm nghiệm lại chưa đến một phần mười các loại dược liệu. Cụ thể, hiện nay chỉ có 2 cơ quan chính có cung cấp và sản xuất các loại chất chuẩn (bao gồm các hoạt chất tổng hợp hóa học và các hoạt chất phân lập dược liệu) là Viện kiểm thuốc trung ương và Viện kiểm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Tại Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương, có hơn 10 loại chất chuẩn có nguồn gốc từ dược liệu còn tại Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh là hơn 20 loại.

---

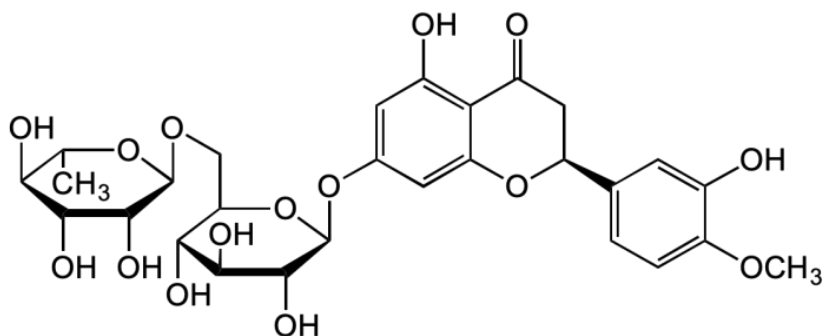
\*Điện thoại: 0987653162 ,Email: vuthithanhan010195@gmail.com

Ngoài ra, vào năm 2008, Nguyễn Minh Đức và các cộng sự đã tiến hành đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước và thực hiện phân lập tinh chế được hơn 24 hợp chất thông dụng từ dược liệu có hàm lượng > 95 % [1].

Do đó, để có thể vừa kịp thời đáp ứng nguồn nguyên liệu để phục vụ quá trình thiết lập chất chuẩn, vừa tiết kiệm thời gian và chi phí cho việc mua các nguyên liệu từ các nhà cung cấp nước ngoài, việc chiết xuất và phân lập cách chất từ dược liệu hiện nay là rất cần thiết.

Hiện nay, trên thị trường các mặt hàng thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc từ dược liệu, nhóm sản phẩm giúp giảm đau, chống oxy hóa đang chiếm một khối lượng lớn bên cạnh các mặt hàng về nhóm xương khớp, giảm cân... Trong số rất nhiều các dược liệu, hoạt chất trong nhóm giảm đau, chống oxy hóa, hesperidin từ dược liệu Trần bì được đánh giá là một trong các hoạt chất có tiềm năng ứng dụng lớn nhờ các tác dụng chống viêm trên hệ thần kinh cũng như tăng cường cải thiện hệ thống miễn dịch cơ thể [2-3]. Cũng chính vì sự đa dạng đó mà nhu cầu kiểm nghiệm, xác định hàm lượng hesperidin trong các sản phẩm cũng ngày một tăng cao và đặt ra yêu cầu cần phải có nguồn nguyên liệu ổn định để xây dựng chất chuẩn hesperidin.

Theo quy định của Dược điển Việt Nam V, dược liệu Trần bì phải chứa ít nhất 3 % hesperidin thì mới đạt yêu cầu. Hesperidin là một glycoside có cấu trúc như Hình 1 có phần aglycon là hesperitin liên kết với 1 đường glucose và 1 đường rhamnose [4].



Hình 1. Cấu trúc phân tử Hesperidin

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là dược liệu trần bì và hoạt chất hesperidin.

### 2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu bao gồm chuẩn hesperidin (Sigma, Code 50162; độ tinh khiết 98,5 %). Ngoài ra, một số hóa chất khác được sử dụng trong quá trình khảo sát, chiết xuất, phân lập bao gồm: methanol, dichloromethan, acetonitril, petroleum ether, ethanol, than hoạt tính, ethylacetat, dimethylsulfoxide, acid acetic, acid phosphoric...

### 2.3. Thiết bị và dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ được sử dụng bao gồm: rung siêu âm, bộ chiết hồi lưu, bộ lọc Buchner, bình ngậm và bình chứa có dung tích thích hợp từ 250 mL đến 2000 mL; các dụng cụ thủy tinh trong phòng thí nghiệm; thiết bị sắc ký lỏng điều chế Alliance e2695 Separation Module kết nối detector Alliance 2998PDA của hãng Waters.

### 2.4. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Xây dựng quy trình xác định hàm lượng hesperidin trong dược liệu trần bì bằng HPLC

Dựa trên tính chất hóa lý và các tài liệu tham khảo [5-6], nghiên cứu đã khảo sát điều kiện phân tích hesperidin trên HPLC. Sau khi hoàn thiện quy trình xử lý mẫu và chọn được các điều kiện phân tích trên thiết bị HPLC, quy trình phân tích hesperidin trong dược liệu và nguyên liệu sẽ được thẩm định đầy đủ các thông số về thẩm định phương pháp hóa học theo yêu cầu của AOAC với các thông số: Độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ tái lập nội bộ, độ thu hồi, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện.

#### 2.4.2. Khảo sát và xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập hesperidin từ dược liệu trần bì.

##### 2.4.2.1. Xây dựng quy trình chiết hesperidin từ dược liệu trần bì

Từ những năm 2002, các phương pháp chiết xuất và phân lập hesperidin đã được xây dựng bằng cách kiềm hóa dịch chiết rồi thay đổi đến pH thích hợp làm kết tủa lại các tinh thể hesperidin thô [7]. Kết hợp cùng các kết quả thu được từ các khảo sát dung môi chiết trong quá trình xây dựng quy trình phân tích hesperidin trong dược liệu trần bì bằng HPLC và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình làm giàu, cô thu hồi dung môi, chi phí và tính an toàn để lựa chọn dung môi chiết thích hợp, nghiên cứu tiếp tục khảo sát lựa chọn phương pháp chiết thích hợp bao gồm 2 phương pháp: Đun hồi lưu và ngâm nóng có sự hỗ trợ của rung siêu âm.

##### 2.4.2.2. Khảo sát quy trình làm sạch hesperidin thô

Dựa trên tính chất khó tan trong một số dung môi hữu cơ của Hesperidin, lượng hesperidin thô thu được từ quá trình chiết sẽ được tiến hành làm sạch theo 3 phương pháp: (1) rửa tạp với methanol, (2) rửa tạp với Dicloromethan; (3) làm sạch với than hoạt tính để lựa chọn phương pháp làm sạch thích hợp để đạt độ tinh khiết > 80 % trước khi chuẩn bị đưa vào tinh chế trên thiết bị sắc ký lỏng điều chế.

##### 2.4.2.3. Khảo sát quy trình tinh chế trên sắc ký lỏng điều chế

Dựa trên các điều kiện tối ưu trên HPLC, hệ dung môi được dùng để khảo sát trên thiết bị sắc ký điều chế gồm:

- Hệ 1: Đẳng dòng kênh A acid phosphoric 1 % : kênh B ACN 50 : 50
- Hệ 2: Đẳng dòng kênh A acid phosphoric 1 % : kênh B ACN 30 : 70
- Hệ 3: Đẳng dòng kênh A acid phosphoric 1 % : kênh B ACN 10 : 90

Cụ thể: dung dịch chuẩn hesperidin 992 ppm được tiêm vào hệ thống sắc ký điều chế lần lượt theo các hệ pha động khảo sát, so sánh hình dáng peak và thời gian lưu để lựa chọn điều kiện thu mẫu trên thiết bị sắc ký điều chế với 2 mục tiêu: (1) thu được hesperidin đã loại bỏ tối đa các hợp chất khác từ dược liệu; (2) tiết kiệm tối đa thời gian và chi phí sản xuất.

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Kết quả xây dựng phương pháp phân tích trên HPLC

Qua khảo sát đã chọn được điều kiện phân tích bao gồm Cột sắc ký: C18 (4,6 mm × 250mm × 5μm); Pha động theo chế độ gradient với: Kênh A H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 %; Kênh B: Methanol; Bước sóng phát hiện: 280 nm

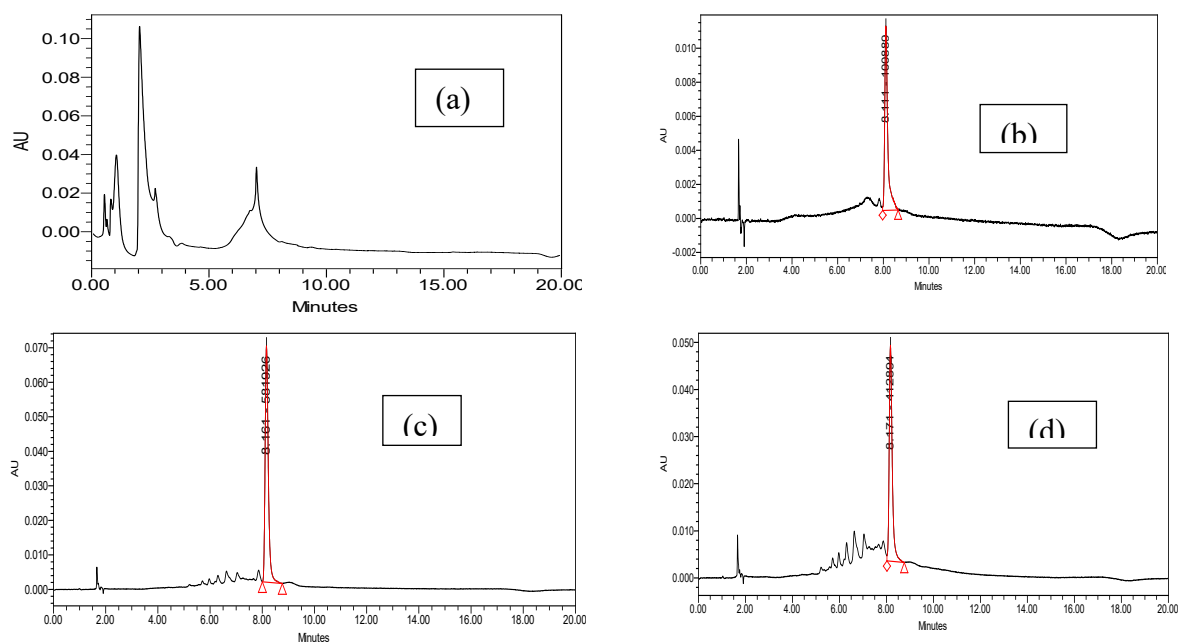
Khảo sát các dung môi chiết gồm DMSO, methanol 70 %, ethanol 70 % và ethanol 100 %. Ethanol 70 % được lựa chọn để chiết hesperidin từ mẫu dược liệu Trần bì. Số lần chiết tối ưu cũng được xác định là 03 lần vì kết quả độ thu hồi sau lần chiết thứ 3 chiếm chưa đến 1% so với tổng hàm lượng chất chiết.

Như vậy, dược liệu Trần bì sau khi được xay nhỏ đồng nhất sẽ được cân chính xác khoảng 1 g mẫu đối với mẫu dược liệu và khoảng 0,1 g đối với mẫu nguyên liệu và ống ly tâm 50 mL sau đó bổ sung thêm khoảng 35 mL dung môi chiết Ethanol 70 %, rung siêu âm trong 30 phút ở 60°C. Ly tâm thu dịch chiết, chiết lặp lại thêm 02 lần. Gộp dịch chiết và định mức đến 100mL. Lọc lấy dịch chiết và pha loãng thích hợp trước khi phân tích trên HPLC.

Tiến hành thẩm định phương pháp xác định hàm lượng hesperidin trong nền dược liệu và nguyên liệu bằng HPLC cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đạt yêu cầu về độ đặc hiệu khi không xuất hiện pic hesperidin trên nền mẫu trắng đồng thời độ lệch thời gian lưu giữa ở mẫu thực, mẫu thực thêm chuẩn với mẫu chuẩn tương ứng là 0,62 % và 0,74 % như Hình 2. Các mẫu chiết dược liệu được tiến hành theo quy trình xử lý và phân tích mẫu để đánh giá độ lặp lại cho kết quả độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,63 % (n = 6); độ tái lặp nội bộ được thực hiện thêm 06 mẫu chiết vào một ngày khác cho độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,64 %. Độ đúng được thực hiện bằng cách thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ, mỗi nồng độ thực hiện 6 lần và đánh giá độ thu hồi. Kết quả thu được độ thu hồi R% từ 97,2 % - 101 %.

Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện được thực hiện bằng các thêm chuẩn ở mức hàm lượng thấp và thực hiện phân tích 10 lần đánh giá giá trị R nằm trong khoảng từ 4 - 10. Kết quả thu được với giá trị giới hạn định lượng là 0,89 mg/g.

Thực hiện tương tự quy trình thẩm định đối với nền mẫu nguyên liệu, sau khi thu được hoạt chất phân lập từ quá trình chiết, tinh chế, nguyên liệu được sử dụng để tiến hành thẩm định quy trình phân tích cho kết quả độ lặp lại với RSD khoảng 0,52 %, độ thu hồi ở cả 03 mức 120 %, 100 % và 80 % đều đạt từ 99,2 % - 101 %.



**Hình 2.** Sắc ký đồ độ đặc hiệu (a) mẫu trắng, (b) mẫu chuẩn Hesperidin, (c) mẫu thêm chuẩn, (d) mẫu thực dược liệu Trần bì

Kết quả khảo sát và xây dựng các phương pháp xác định hesperidin trên nền dược liệu, nguyên liệu cho thấy 02 phương pháp HPLC phù hợp làm công cụ để xác định hàm lượng hesperidin cũng như xác định độ tinh khiết của hesperidin trong từng giai đoạn.

### 3.2. Quy trình chiết xuất

Đối với quy trình chiết mẫu, kết quả khảo sát phương pháp chiết mẫu cho thấy trong cùng một thời gian chiết là 2 giờ, cùng chung một lượng dược liệu cũng như lượng dung môi chiết, phương pháp chiết đun hồi lưu cho khả năng chiết cao hơn gần như gấp đôi so với phương pháp ngâm nóng có sử dụng rung siêu âm, màu sắc của dịch chiết cũng có sự khác biệt lớn bởi sự tuần hoàn dung môi và khả năng thâm vào các mảnh dược liệu nhỏ tốt hơn khi có sự sôi của dung môi chiết của phương pháp đun hồi lưu.

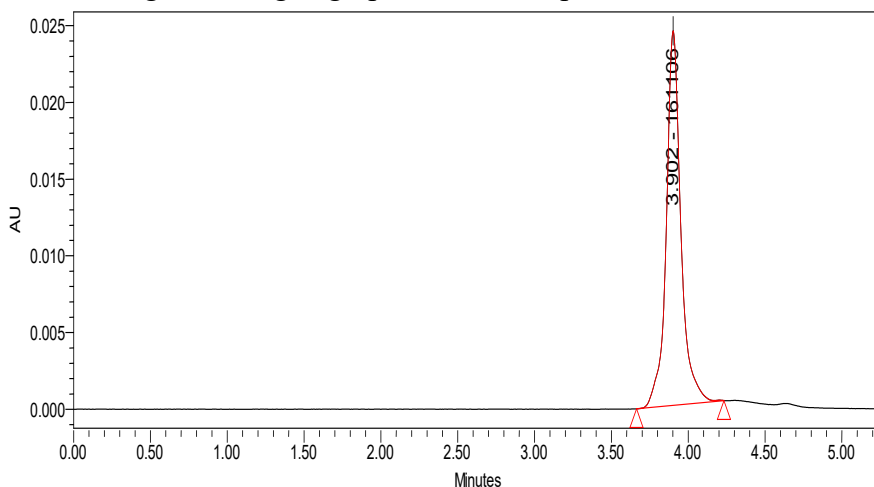
### 3.3. Quy trình làm sạch và tinh chế trên sắc ký lỏng điều chế

#### 3.3.1. Quá trình làm sạch

Hesperidin thô thu được sau chiết sẽ được đem tiến hành làm sạch cho thấy việc rửa tạp với methanol và dichloromethan cho hiệu quả không cao. Về cảm quan, cần thu được sau rửa có màu giống trước khi rửa, ngoài ra, trong quá trình rửa và thu cần trở lại có tình trạng mất mẩu lớn do quá trình lọc và rửa trong cốc có mỏ và đổ loại bỏ dung môi rửa. Ngược lại, đối với việc hấp thụ tạp màu bằng than hoạt tính cho hiệu quả tốt hơn. Đầu tiên về mặt cảm quan, màu sắc của cần sau loại tạp sạch và có màu vàng nhạt hơn so với cần thô. Hiệu suất của quá trình loại tạp cũng tốt hơn do toàn bộ quá trình chỉ xảy ra trong một bình hấp phụ và được cô dung môi làm giàu mẫu.

### 3.3.2. Quá trình tinh chế trên sắc ký điều chế

Khảo sát trên thiết bị sắc ký lỏng điều chế cho thấy hệ pha động đẳng dòng gồm kênh A acid phosphoric 1 %, kênh B Acetonitril tỷ lệ 30 : 70 là hệ cho hình dáng peak ổn định như Hình 3, thời gian lưu ngắn giúp tiết kiệm chi phí nhất.



**Hình 3.** Sắc ký đồ thu dịch tinh chế trên thiết bị sắc ký điều chế

Cẩn sau làm sạch được hòa tan trở lại trong ethanol 70 % và được tinh chế trên thiết bị sắc ký điều chế theo quy trình trên với tốc độ dòng 60 mL/ph cho phần dịch chiết thu được từ phút 3,75 đến phút 4,00. Phần dịch sau tinh chế này được cô dung môi làm giàu và phần cẩn sau khi cô sẽ được lọc thu hesperidin thu được sản phẩm cuối như Hình 4 được sau toàn bộ quá trình sẽ được đem xác định các đặc tính về cảm quan, phổ đồ.



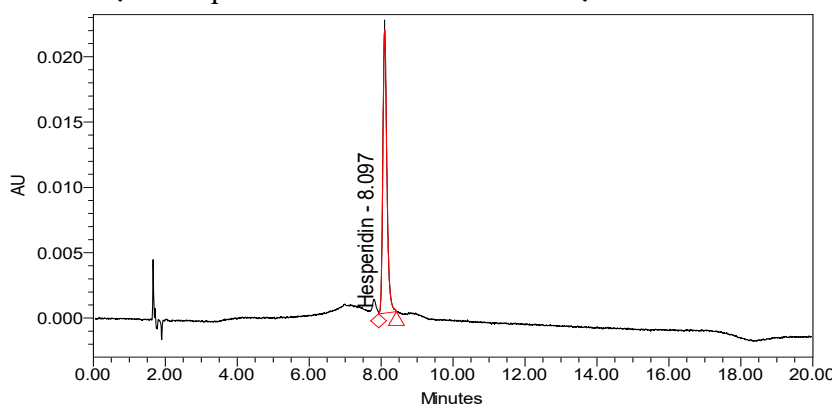
**Hình 4.** Sản phẩm hesperidin (Từ trái sang phải: hesperidin thô; hesperidin sau làm sạch; hesperidin tinh chế)

Sản phẩm hesperidin thu được sau quá trình tinh chế được tiến hành phân tích xác định hàm lượng theo quy trình đã được thẩm định trên nền nguyên liệu với số lần lặp  $n = 6$ . Giá trị hàm lượng trung bình hesperidin trong mẫu được xác định là 96,58 % (chưa tính hàm ẩm) như trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Giá trị hàm lượng hesperidin trong mẫu tinh chế

<i>STT</i>	<i>m (g)</i>	<i>V (mL)</i>	<i>k</i>	<i>Diện tích pic</i>	<i>Nồng độ (µg/ml)</i>	<i>Hàm lượng (mg/g)</i>	<i>TB (mg/g)</i>	<i>RSD (%)</i>
1	0,1015	100	25	638299	39,0	961		
2	0,1000	100	25	629938	38,5	962		
3	0,1003	100	25	639495	39,1	974		
4	0,1004	100	25	638414	39,0	971	965	1,08
5	0,1025	100	25	636082	38,9	948		
6	0,1002	100	25	639880	39,1	976		

Như vậy, sau quá trình chiết xuất và tinh chế hesperidin từ dược liệu Trần bì từ 104,94 g dược liệu ban đầu, nghiên cứu đã thu được 1,35 g nguyên liệu hesperidin với độ tinh khiết 96,58 % (HPLC). Quy trình chiết xuất và tinh chế được tiến hành như sau: Dược liệu Trần bì được loại bỏ tạp thô và xay nhỏ đến kích thước khoảng 0,5 - 1 cm, ngâm loại béo bằng petroleum ether tỷ lệ 100 g dược liệu : 500 mL dung môi. Loại bỏ phần dung môi, để khô tự nhiên, tiến hành chiết đun hồi lưu với tỷ lệ 100 g dược liệu 500 mL dung môi ethanol 70 %, chiết 03 lần. Dịch chiết thu được đem cô thu hồi dung môi để thu được khoảng 50 - 100 mL dịch sau cô. Chỉnh pH dịch sau cô về 4,0 - 4,5 bằng HCl. Bổ sung thêm 100 mL methanol, để lạnh kết tinh qua đêm. Lọc trên phễu lọc thu cặn hesperidin thô. Phân tán lại hesperidin thô trong ethanol 70 % thêm than hoạt tính theo tỷ lệ 5 g hesperidin thô : 1L dung môi : 2,5 g than hoạt tính. Rung siêu âm trong 1 - 2 h tại 30°C. Lọc nóng loại bỏ than hoạt tính. Dịch được lọc lại qua màng 0,22 µm. Cô dung môi thu hesperidin sau làm sạch. Hòa tan hesperidin sau làm sạch bằng methanol (có bổ sung 1 - 2 giọt DMSO trợ tan) tinh chế trên sắc ký điều chế. Dịch thu trên thiết bị điều chế được cô thu hồi dung môi, chỉnh pH về 4,0 - 4,5, kết tủa lại bằng methanol và lọc thu sản phẩm. Sắc ký đồ nguyên liệu hesperidin thu được sau quá trình chiết và tinh chế được đưa ra ở Hình 5.



**Hình 5.** Sắc ký đồ nguyên liệu hesperidin thu được sau quá trình chiết và tinh chế

#### IV. KẾT LUẬN

Trần bì sử dụng các dung môi đơn giản kết hợp cùng thiết bị sắc ký điều chế đã thu được 1,35 g nguyên liệu hesperidin có độ tinh khiết 96,58 % (HPLC) từ khoảng 100 g dược liệu trần bì. Tuy nhiên, với việc sử dụng thiết bị sắc ký điều chế, chi phí cho việc nâng cao độ tinh khiết của toàn bộ quy trình phân lập đẩy lên rất nhiều do lượng dung môi sử dụng lớn. Do đó, cần tiếp tục xem xét và tối ưu hóa cho quá trình tinh chế này cũng như tìm ra phương thức tối ưu để tận dụng lượng dung môi loại bỏ trong quá trình tinh chế.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia với đề tài “Chiết xuất và phân lập hesperidin từ dược liệu Trần bì” với mã số đề tài NIFC.ĐTCS.21.02.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N. M. Duc, Preparation and establishment of standard substances from nature to serve the research, testing, and standardization of medicinal herbs and traditional medicines", Center for Science and Technology Communication of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, 2013.
- [2]. K. Jeongtae, W. Myung-Bok, A. Meejung, A. Tanaka, H. Matsuda, and Taekyun Shin, “Benefits of hesperidin in central nervous system disorders: a review,” *Anatomy & Cell Biology*, 2019.
- [3]. A. Roohbakhsh, H. Parhiz, F. Soltani, R. Rezaee and, M. Iranshahi, “Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases,” *Life Sciences*, 2014.
- [4]. A. Garg, S. Garg, L. J. D. Zaneveld, and A. K. Singla, “Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin,” *Phytother, Res.* 15, pp. 655-669, 2001.
- [5]. M. Szymański, D. Młynarek, A. Szymański and, I. Matławska, “Simultaneous Determination of Diosmin and Hesperidin in Pharmaceuticals by RPLC using Ionic Liquids as Mobile Phase Modifiers,” *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 1, pp. 141-148, 2016.
- [6]. A. N. Adham, “Qualitative and Quantitative Estimation of Hesperidin in Peel and Juice of Citrus Fruits by RP-HPLC Method Growing in Kurdistan Region/Iraq,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 33, no 2, pp. 220-224, 2015.
- [7]. G. Dugo and A. Di Giacomo, “A. Citrus: The genus Citrus”, *Taylor & Francis: London, UK*, 1st ed.; 2002; pp. 169-170.



## Development of the process for extracting and isolating hesperidin from Chenbi to establish as a reference standard

Vu Thi Thanh An<sup>1\*</sup>, Cao Cong Khanh<sup>1</sup>, Mac Thi Thanh Hoa<sup>1</sup>,  
Tran Hung Son<sup>1</sup>, Do Thi Thanh Thuy<sup>2</sup>, Nguyen Thi Huyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

### *Abstract*

Hesperidin is the main active ingredient in the flavonoid group, accounting for about 3 % of Chenbi. According to studies, hesperidin has anti-oxidant, analgesic, and anti-inflammatory effects on the nervous system as well as enhancing the body's resistance. Chenbi is a simple medicine, easy to obtain, and uses medicinal material for the potential extraction and isolation of Hesperin with high yield. The study developed and validated the process of determining hesperidin on medicinal samples and raw materials by HPLC. The study was successful in making the active ingredient hesperidin with a purity > 95 % (HPLC) sufficient as a condition to be used as a referenced material. Extraction and isolation process using 70 % ethanol extraction solvent with extraction method is reflux heating then cleaning with activated carbon and purified on chromatographic equipment to obtain high recovery efficiency, simple and economical process.

**Keywords:** *Hesridin, extraction, isolation, Chenbi.*