

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHD.2026.009>

TINH CHẾ CHỌN LỌC ASIATICOSIDE TỪ CAO ĐẶC RAU MÁ (*Centella asiatica*, Apiaceae) BẰNG HỆ THỐNG HAI PHA NƯỚC

Thái Hồng Đăng^{1,2,*}, Nguyễn Thị Hồng Phúc¹¹Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh²Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hệ thống hai pha nước (Aqueous Two-Phase System - ATPS) là giải pháp chiết xuất xanh tiềm năng, giúp phân lập và làm giàu hoạt chất an toàn mà không dùng dung môi hữu cơ độc hại, mang lại hiệu suất cao, ứng dụng quy mô lớn. **Mục tiêu:** Nghiên cứu quy trình ATPS tinh chế asiaticoside từ cao đặc Rau má (*Centella asiatica*, Apiaceae) thông qua khảo sát khả năng tạo pha của các hệ alcohol/muối. **Đối tượng và phương pháp:** Xây dựng giản đồ pha bằng phương pháp điểm vẩn đục, mô hình hóa bằng phương trình Merchuk. **Hiệu quả tinh chế** đánh giá bằng hệ số phân bố (K) và hiệu suất chiết ($Y\%$). **Kết quả:** Đã thiết lập phương trình Merchuk hệ isopropanol với các muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$ ($R^2 > 0.995$). Trong đó, hệ ATPS gồm 20% isopropanol / 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w) cho hiệu quả tốt nhất, hàm lượng asiaticoside trong sản phẩm tăng từ 0.50 lên 1.67%, đạt hệ số $K = 1.97$ và $Y = 66.3\%$ chỉ sau một bước chiết phân bố. **Kết luận:** Quy trình vận hành đơn giản, thời gian tách pha nhanh và các thành phần (dung môi, muối) có khả năng tái sử dụng cao. Việc ứng dụng phương trình Merchuk cho phép dự đoán thành phần pha, tạo tiền đề quan trọng cho việc tính toán thiết kế và nâng cấp quy mô sản xuất.

Từ khóa: cao đặc Rau má, *Centella asiatica*, asiaticoside, ATPS

SELECTIVE SEPARATION OF ASIATICOSIDE FROM *Centella asiatica* (Apiaceae) EXTRACT BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

Thai Hong Dang, Nguyen Thi Hong Phuc

ABSTRACT

Background: The Aqueous Two-Phase System (ATPS) has emerged as a promising green extraction technology that facilitates the safe isolation and enrichment of target bioactive compounds without the use of toxic organic solvents, ensuring high yield and scalability. **Objective:** This study aimed to apply ATPS for the purification of asiaticoside from *Centella asiatica* (Apiaceae) extract. The phase-forming abilities of various alcohol/inorganic salt systems were investigated. **Materials and Methods:** Binodal curves were constructed using the cloud-point method and mathematically modeled using the Merchuk equation. The purification efficiency was evaluated through the partition coefficient (K) and extraction yield ($Y\%$). **Results:** The Merchuk equation was successfully established for systems comprising isopropanol and various salts $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$ with high reliability ($R^2 > 0.995$). The optimal configuration was identified as an ATPS comprising 20% isopropanol and 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/w). Using this system, the asiaticoside content in the product increased significantly from 0.50% to 1.67%, achieving a partition coefficient of $K = 1.97$ and a yield of $Y = 66.3\%$ in a single extraction step. **Conclusion:** The process demonstrated significant advantages, including simple operation, rapid phase separation, and high potential for the recycling of phase-forming components. Furthermore, the application of the Merchuk equation enables the prediction of phase compositions, providing a crucial foundation for process design and industrial scale-up.

Keywords: *Centella asiatica* extract, asiaticoside, Aqueous Two-Phase System (ATPS)

* Tác giả liên hệ: Thái Hồng Đăng, Email: th.dang@hutech.edu.vn

(Ngày nhận bài: 07/4/2026; Ngày nhận bản sửa: 28/4/2026; Ngày duyệt đăng: 07/5/2026)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rau má (*Centella asiatica*, Apiaceae) là một dược liệu quen thuộc, phân bố rộng rãi ở các nước nhiệt đới như Việt Nam, Ấn Độ, Trung Quốc. Trong y học cổ truyền và hiện đại, Rau má được sử dụng để điều trị các bệnh ngoài da, thấp khớp, suy tĩnh mạch và hỗ trợ thần kinh [1]. Tác dụng dược lý này chủ yếu đến từ các dẫn xuất saponin triterpenoid, tiêu biểu là asiaticoside và madecassoside. Trong đó, asiaticoside đã được chứng minh có tác dụng thúc đẩy quá trình lành vết thương, kích thích tổng hợp collagen, đồng thời thể hiện đặc tính chống viêm và chống oxy hóa [2].

Mặc dù được ứng dụng nhiều thập kỷ, phương pháp chiết phân bố cổ điển sử dụng các dung môi hữu cơ như ether, cloroform, dicloromethan,... vẫn có nhiều hạn chế như lượng dung môi sử dụng lớn, thiết bị phức tạp và các vấn đề liên quan đến môi trường, tồn dư dung môi trong sản phẩm dẫn đến khó khăn trong sản xuất công nghiệp [3].

Để giải quyết vấn đề này, hệ thống hai pha nước (Aqueous Two-Phase System - ATPS) được xem là một giải pháp chiết xuất xanh đầy triển vọng. Hiện tượng tách pha nước được Beijerinck tình cờ phát hiện lần đầu tiên vào năm 1896 từ hỗn hợp gelatin và agar. Tuy nhiên, tiềm năng của công nghệ này chỉ thực sự được khai phá vào năm 1956 khi Albertsson tiên phong thiết lập các hệ ATPS (bao gồm polymer/polymer và polymer/muối vô cơ) để phân lập các phân tử sinh học [4]. Bản chất của ATPS là một hệ thống dị thể được hình thành từ ít nhất hai thành phần hòa tan trong nước, tạo ra hai pha lỏng có hàm lượng nước rất cao. Đặc tính này giúp ATPS khắc phục nhược điểm của kỹ thuật truyền thống nhờ tính tương thích sinh học cao, sức căng bề mặt thấp, thiết bị vận hành đơn giản và khả năng mở rộng quy mô dễ dàng [4, 7]. Gần đây, hệ ATPS alcohol/muối đã được ứng dụng thành công trong việc phân lập nhiều hợp chất tự nhiên từ dịch chiết thực vật với ưu điểm thân thiện với môi trường, hiệu suất thu hồi cao, thời gian chiết xuất ngắn [6, 8, 10].

Dựa trên cơ sở đó, nghiên cứu này tập trung ứng dụng công nghệ ATPS để tinh chế cao đặc Rau má nhằm làm giàu hàm lượng asiaticoside một cách hiệu quả, từ đó xây dựng quy trình an toàn, bền vững để sản xuất nguồn nguyên liệu chuẩn hóa phục vụ cho ngành công nghiệp dược phẩm, mỹ phẩm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cao đặc Rau má do Công ty TNHH Sản xuất thương mại Hồng Đài Việt cung cấp. Số lô: NC010125, ngày sản xuất: 08/01/2025, hạn sử dụng: 08/01/2027. Độ ẩm 13.16%; hàm lượng asiaticoside 0.50%. Bảo quản mẫu trong tủ mát dưới 15°C.

Hoá chất:

- Chất chuẩn asiaticoside do Trung tâm Nghiên cứu thử nghiệm Hóa Dược (NatPro) cung cấp. Số lô: CA010625, ngày sản xuất: 01/06/2025. Độ tinh khiết 97.25% nguyên trạng theo HPLC-DAD. Bảo quản ở 2 - 8°C.

- Acetonitril (HPLC grade) do Fisher sản xuất, nước cất 2 lần do CTCP Kỹ nghệ Nam Hà cung cấp.

- Các hóa chất (PA grade) sử dụng trong nghiên cứu do Xilong Scientific (Trung Quốc) sản xuất.

Thiết bị: Cân phân tích Ohaus PA214, máy khuấy từ gia nhiệt IKA C-MAG HS 7, bếp cách thủy Memmert WNB 45, tủ sấy Memmert UN55, các dụng cụ phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

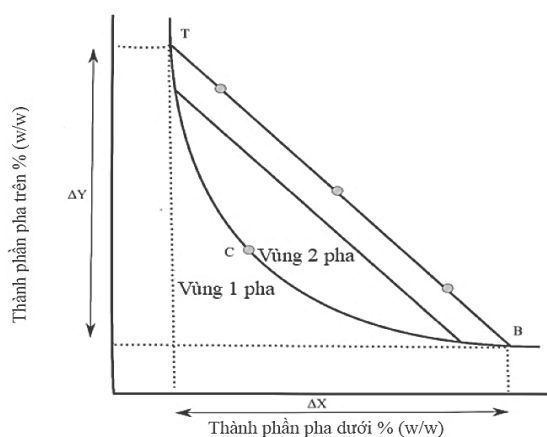
2.2.1. Khảo sát khả năng tạo hệ thống hai pha nước

Quá trình sàng lọc các hệ dung môi và muối được thực hiện để đánh giá khả năng tách pha. Các dung dịch muối vô cơ bao gồm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , NaCl được chuẩn bị trong các ống nghiệm thủy tinh. Lần lượt bổ sung các alcohol (isopropanol, ethanol, methanol) vào từng ống dung dịch muối. Hỗn hợp được lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng. Các hệ alcohol - muối thể hiện sự hình thành bề mặt phân cách hai pha lỏng rõ ràng, được lựa chọn để tiến hành bước xây dựng giản đồ pha tiếp theo.

2.2.2. Xây dựng giản đồ pha

Giản đồ pha (Hình 1) thể hiện vùng làm việc tiềm năng của hệ ATPS được thiết lập thông qua phương pháp điểm vân đục (Cloud point method) [4]. Cụ thể, một lượng muối xác định được hòa tan hoàn toàn vào nước cất. Dung môi được nhỏ từ từ vào dung dịch muối bằng micropipette dưới sự khuấy trộn liên tục bằng cá từ cho đến khi dung dịch xuất hiện trạng thái vân đục (điểm bắt đầu tách pha), ghi nhận khối lượng từng thành phần. Sau đó tiếp tục thêm từng giọt nước và khuấy đều cho đến khi hỗn hợp chuyển trở lại trạng thái trong suốt, ghi nhận khối lượng để tính lượng nước đã thêm. Lặp lại thao tác cho đến khi lượng dung môi bổ sung không còn gây ra hiện tượng vân đục.

Mỗi cặp giá trị thành phần của hệ được biểu diễn bằng một điểm trên đồ thị. Giản đồ pha được xây dựng thông qua tập hợp các điểm phần trăm khối lượng muối (%w/w) và phần trăm khối lượng dung môi (%w/w). Đường cong binodal được mô hình hóa theo phương trình Merchuk bằng phương pháp hồi quy phi tuyến tính, sử dụng công cụ Solver được tích hợp trong phần mềm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ) [5]: $Y = A \exp(BX^{0.5} - CX^3)$. Trong đó Y, X lần lượt là nồng độ thành phần dung môi và muối; A, B, C là các thông số điều chỉnh.



Hình 1. Mô hình giản đồ pha

*Vùng 2 pha (phía trên đường cong binodal) và vùng 1 pha (bên dưới đường cong binodal)
Điểm đầu T (top point), điểm cuối B (bottom point) và điểm tới hạn C (critical point)*

2.2.3. Xác định đường nối Tie-line

Đường nối Tie-line (TL) là đoạn thẳng đi xuyên qua vùng dị thể, nối liền hai điểm T và B nằm trên đường cong binodal khi hệ thống đạt trạng thái cân bằng nhiệt động [4]. Để xác định các thông số của đường nối TL, một hệ ATPS có nồng độ (X_M, Y_M) nằm trong vùng 2 pha được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khối lượng các thành phần. Hỗn hợp được khuấy trộn và để yên tĩnh ở nhiệt độ phòng cho đến khi phân tách hoàn toàn thành hai pha trong suốt.

Tỉ lệ khối lượng (α) được xác định bằng công thức:

$$\alpha = \frac{m_T}{m_{total}}$$

Trong đó, m_T là khối lượng pha trên và m_{total} là tổng khối lượng của hệ thống.

Tọa độ nồng độ (% w/w) của pha trên T (X_T, Y_T) và pha dưới B (X_B, Y_B) được xác định thông qua việc giải hệ 4 phương trình phi tuyến tính bằng công cụ Solver, kết hợp giữa phương trình Merchuk và quy tắc cân bằng khối lượng:

- $Y_T = A \exp(BX_T^{0.5} - CX_T^3)$ (Điểm T nằm trên đường binodal)

- $Y_B = A \exp(BX_B^{0.5} - CX_B^3)$ (Điểm B nằm trên đường binodal)

- $Y_T = \frac{Y_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} Y_B$ (Cân bằng khối lượng dung môi)

$$- X_T = \frac{X_M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} X_B \text{ (Cân bằng khối lượng muối)}$$

Sau khi xác định được tọa độ T và B, tiến hành tính toán hai thông số quan trọng:

- Chiều dài đường nối TL (Tie-line Length - TLL): Thể hiện mức độ khác biệt về nồng độ giữa hai pha.

$$TLL = \sqrt{(X_T - X_B)^2 + (Y_T - Y_B)^2}$$

- Độ dốc đường nối TL (Slope of Tie-line - STL): Giúp hiểu rõ hơn về xu hướng phân bố của các thành phần.

$$STL = \frac{Y_T - Y_B}{X_T - X_B}$$

2.2.4. Thử nghiệm tinh chế cao đặc Rau má

Chuẩn bị bình lắc gạn có chứa lượng muối và dung môi hữu cơ (theo tỷ lệ nồng độ % w/w đã được xác định từ giản đồ pha), bổ sung 10 g mẫu cao đặc Rau má, thêm nước cất vừa đủ 100 g. Lắc đều bình lắc gạn và để yên 30 phút. Sau khi hệ thống phân lớp hoàn toàn, pha trên và pha dưới được tách riêng biệt.

Định lượng thành phần asiaticoside có trong pha trên bằng hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC LC - 2030C 3D Plus (Shimadzu) với đầu dò DAD. Quá trình phân tích được thực hiện trên cột sắc ký COSMOSIL 5C18-AR-II (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) Điều kiện sắc ký pha động Acetonitril 70% - H₂O 30%; bước sóng phát hiện 210 nm; tốc độ dòng 0.7 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 10 μL, nhiệt độ cột 30°C; thời gian phân tích 35 phút.

Hiệu quả tinh chế của phương pháp được đánh giá dựa vào hệ số phân bố (K) và hiệu suất chiết (Y%) [6].

Hệ số phân bố (K) thể hiện xu hướng di chuyển của asiaticoside giữa hai pha được tính toán theo công thức:

$$K = \frac{m_T}{m_B}$$

Hiệu suất chiết (Y%) tính bằng tỷ lệ phần trăm khối lượng asiaticoside ở pha trên so với tổng khối lượng asiaticoside ban đầu có trong 10 g cao nguyên liệu:

$$Y\% = \frac{m_T}{m_T + m_B} \times 100\%$$

Trong đó: m_T, m_B (g) lần lượt là khối lượng asiaticoside định lượng được ở pha trên và pha dưới sau khi tách pha.

3. KẾT QUẢ

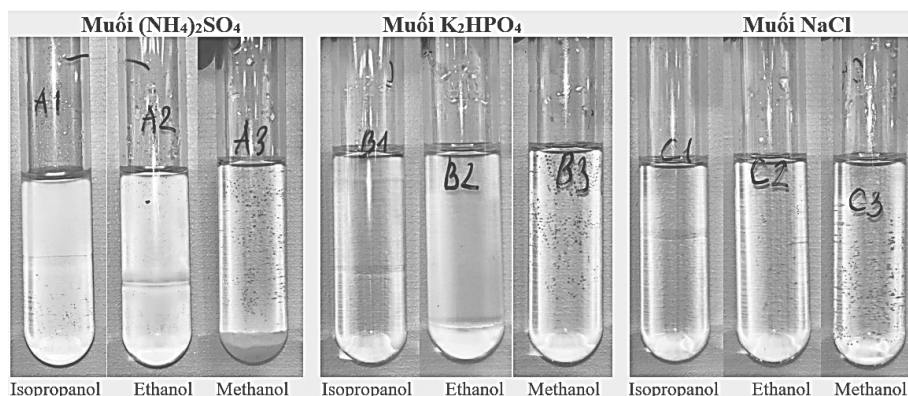
3.1. Khảo sát khả năng tạo hệ thống hai pha nước

Khả năng hình thành hệ thống hai pha nước phụ thuộc vào bản chất nhiệt động học của dung môi hữu cơ (độ phân cực, tính kỵ nước) và năng lực hydrat hóa của muối vô cơ tham gia vào hệ thống. Kết quả khảo sát sự tách pha của 3 loại alcohol mạch ngắn (methanol, ethanol, isopropanol) kết hợp với 3 loại muối vô cơ (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, NaCl được trình bày chi tiết trong Bảng 1 và Hình 2.

Bảng 1. Khảo sát khả năng tách pha của các hệ ATPS alcohol - muối

Dung môi	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	NaCl
Methanol	(-)	(-)	(-)
Ethanol	(+)	(+)	(-)
Isopropanol	(+)	(+)	(+)

Ghi chú: (+) Có xảy ra sự tách pha; (-) Không xảy ra sự tách pha



Hình 2. Sự tách pha của các hệ ATPS alcohol - muối

Kết quả thực nghiệm cho thấy sự khác biệt rõ rệt về năng lực tạo hệ ATPS giữa các dung môi. Đối với methanol, không có sự tách pha nào được ghi nhận ở cả 3 loại muối khảo sát, nguyên nhân là do methanol có chuỗi carbon ngắn nhất, độ phân cực rất cao.

Khi tăng chiều dài chuỗi carbon (giảm độ phân cực), khả năng tách pha được cải thiện. Ethanol có thể hình thành hệ ATPS với các muối có mật độ điện tích cao như $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 . Theo chuỗi Hofmeister, các anion như SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} có năng lực hydrat hóa mạnh, đủ sức phá vỡ liên kết giữa ethanol và nước, đẩy dung môi này lên pha trên. Tuy nhiên, hệ ethanol không thể tách lớp với NaCl do anion Cl^- có lực kết tủa muối (salting out) yếu hơn.

Khác biệt hoàn toàn với hai dung môi trên, isopropanol (IPA) thể hiện khả năng tạo hệ ATPS với cả 3 loại muối nhờ có gốc hydrocarbon phân nhánh lớn nhất trong 3 loại dung môi khảo sát. IPA có tính kỵ nước cao nhất và hằng số điện môi thấp nhất [5]. Do đó, lực tương tác giữa IPA và nước tương đối yếu, tạo điều kiện thuận lợi để các ion vô cơ dễ dàng cạnh tranh các phân tử nước xung quanh, đẩy IPA ra khỏi dung dịch để hình thành bề mặt phân cách hai pha lỏng rõ ràng.

Từ các kết quả sàng lọc và phân tích trên, nghiên cứu lựa chọn dung môi isopropanol để xây dựng giản đồ pha với các muối $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , NaCl.

3.2 Xây dựng giản đồ pha

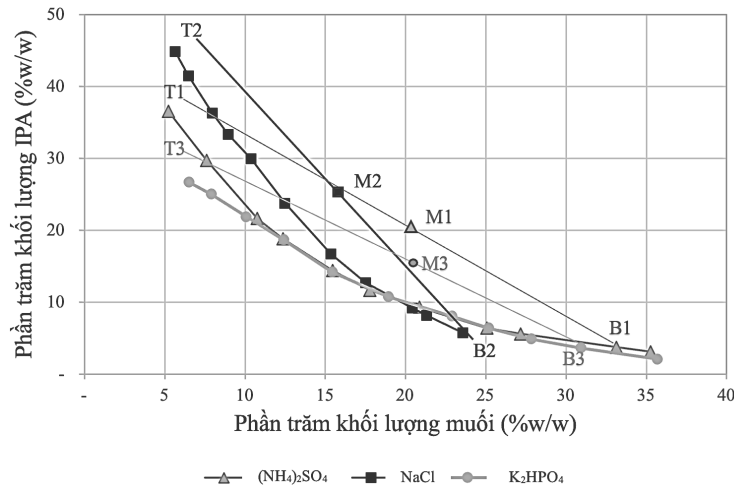
Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng 28°C. Sau khi ghi nhận được đủ các điểm để xây dựng giản đồ pha bằng phương pháp chuẩn độ đục, đường cong binodal được mô hình hóa theo phương trình Merchuk với các thông số điều chỉnh A, B, C (Bảng 2).

Bảng 2. Các giá trị của phương trình Merchuk khảo sát ở nhiệt độ 28°C

Hệ ATPS	A	B	C	R ²
IPA - $(NH_4)_2SO_4$	127.14	-0.53	0.000015	0.998
IPA - K_2HPO_4	70.26	-0.36	0.000033	0.997
IPA - NaCl	125.02	-0.42	0.000085	0.998

Phương trình Merchuk có độ tương thích cao với dữ liệu thực nghiệm, hệ số tương quan của cả ba hệ ATPS đều đạt giá trị rất cao ($R^2 > 0.995$). Điều này khẳng định độ tin cậy của các thông số hồi quy trong việc nội suy và dự đoán chính xác tọa độ điểm trên đường cong binodal.

Năng lực kết tủa muối của các loại muối vô cơ có thể được đánh giá trực quan thông qua vị trí của đường cong binodal trên giản đồ pha (Hình 3), càng nằm gần gốc tọa độ, hệ thống càng dễ tách pha, tức là đòi hỏi nồng độ muối và dung môi thấp hơn để tạo nên sự phân tách. Chính vì vậy, khả năng kết tủa muối giảm dần theo thứ tự $K_2HPO_4 > (NH_4)_2SO_4 > NaCl$.



Hình 3. Giải đồ pha và đường nối TL các hệ ATPS IPA-muối

3.3. Xác định đường nối Tie-line

Mặc dù đường cong binodal giúp xác định ranh giới tách pha, trạng thái cân bằng thực tế và tỷ lệ phân bố của các thành phần trong hệ thống chỉ có thể được đánh giá định lượng thông qua các thông số của đường nối TL. Tọa độ nồng độ của điểm T, B cùng với độ dài TLL và độ dốc STL của 3 hệ thống ATPS được tổng hợp trong Bảng 3.

Bảng 3. Thông số các thành phần, độ dài và độ dốc của đường nối TL các hệ ATPS

Hệ ATPS	M	T	B	Độ dài đường nối (TLL)	Độ dốc đường nối (STL)
	IPA / muối (%w/w)				
IPA - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20.00 / 20.00	38.38 / 5.09	3.36 / 33.48	45.08	-1.23
IPA - K_2HPO_4	15.00 / 20.00	31.39 / 4.95	3.74 / 30.32	37.51	-1.08
IPA - NaCl	25.00 / 15.00	46.18 / 5.46	4.88 / 24.05	45.29	-2.22

Chiều dài đường nối TLL càng lớn, hai pha càng có sự phân hóa rõ rệt về độ phân cực, đẩy các hợp chất mục tiêu phân bố chọn lọc về một pha [7].

Kết quả thực nghiệm cho thấy hệ IPA - NaCl đạt giá trị TLL cao nhất (45.29) mặc dù theo chuỗi Hofmeister, ion Cl^- kết tủa muối yếu hơn so với 2 ion còn lại. Sự khác biệt xuất phát từ đặc tính hòa tan thực tế và việc điều chỉnh điểm M2 (25.00/15.00%) trong quá trình thực nghiệm. Việc sử dụng nồng độ muối NaCl 20% (w/w) không hòa tan hoàn toàn và buộc phải giảm nồng độ xuống mức 15%. Tuy nhiên, do bản chất lực kết tủa muối của NaCl yếu, ở ngưỡng 15% muối, hệ thống vẫn cần bổ sung một lượng lớn isopropanol lên đến 25% (w/w) mới đủ để phá vỡ liên kết hydro và diễn ra sự tách pha. Chính việc buộc phải gia tăng tỷ lệ dung môi ban đầu này đã đẩy hệ NaCl nằm sâu vào vùng dị thể và kéo dài khoảng cách TLL. Khi xét trong cùng một điều kiện nồng độ muối 20%, hệ IPA - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho TLL (45.08) vượt trội hơn so với K_2HPO_4 (36.59), minh chứng rõ nét cho năng lực hydrat hóa và phân tách tốt của ion SO_4^{2-} .

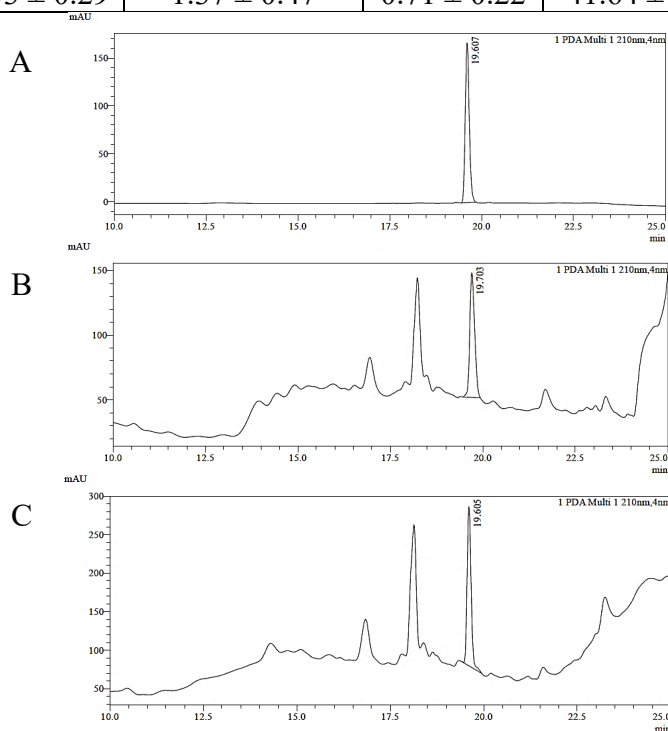
Cả 3 hệ ATPS đều có giá trị STL âm, với giá trị tuyệt đối $|\text{STL}| > 1$ (lần lượt là 1.23; 1.08; và 2.22), cho thấy sự biến thiên nồng độ của IPA giữa hai pha lớn hơn nhiều so với sự biến thiên nồng độ của muối.

3.4. Kết quả tinh chế cao đặc Rau má

Mục tiêu cốt lõi của việc ứng dụng hệ thống hai pha nước là khả năng phân bố chọn lọc và làm giàu hàm lượng hoạt chất từ cao nguyên liệu. Hiệu quả tinh chế asiaticoside của 3 hệ thống được đánh giá thông qua khối lượng sản phẩm, hàm lượng hoạt chất, hệ số phân bố (K) và hiệu suất chiết (Y%) thu được từ phân tích HPLC (Bảng 4, Hình 4).

Bảng 4. Hệ số phân bố và hiệu suất thu hồi asiaticoside sau tinh chế với các hệ ATPS

Hệ ATPS	Điểm	TLL	KL sản phẩm (g)	Hàm lượng asiaticoside (%)	Hệ số phân bố K	Hiệu suất chiết Y%
IPA - (NH ₄) ₂ SO ₄	M1	45.08	1.98 ± 0.11	1.67 ± 0.10	1.97 ± 0.30	66.30 ± 3.70
IPA - K ₂ HPO ₄	M3	37.51	2.84 ± 0.22	0.83 ± 0.04	0.83 ± 0.07	45.32 ± 2.39
IPA - NaCl	M2	45.29	1.53 ± 0.29	1.37 ± 0.47	0.71 ± 0.22	41.64 ± 8.14



Hình 4. Hình ảnh phân tách cao đặc Rau má (trái) và sắc kí đồ HPLC phân tích asiaticoside (phải) (A: Chuẩn Asiaticoside 250 mcg/mL; B: Cao nguyên liệu Rau má; C: Cao tinh chế hệ IPA - (NH₄)₂SO₄)

Hệ IPA - (NH₄)₂SO₄ là sự lựa chọn tốt cho quá trình tinh chế, với hệ số phân bố K = 1.97 (K > 1) cho thấy phần lớn asiaticoside ưu tiên tập trung ở pha trên. Đồng thời, hiệu suất chiết (Y%) cao nhất ở mức 66.30% và hàm lượng asiaticoside trong sản phẩm đạt 1.67% chỉ với 1 lần lắc phân bố.

Trái ngược với dự đoán ban đầu, mặc dù hệ IPA - NaCl có chiều dài đường nổi TLL dài nhất và pha trên giàu dung môi hữu cơ nhất, hiệu quả chiết xuất lại kém nhất với K = 0.71 (hoạt chất ưu tiên nằm lại pha dưới) và hiệu suất chỉ đạt 41.64%. Hiện tượng này có thể được giải thích thông qua bản chất hóa lý của sự phân tách, pha trên chứa một lượng lớn isopropanol ban đầu (25%) quá kém phân cực đối với phần chuỗi đường của asiaticoside, làm giảm độ hòa tan của hợp chất. Thêm vào đó, khối lượng sản phẩm thu được của hệ này là thấp nhất (1.5325 g), cho thấy một lượng đáng kể hoạt chất và tạp chất có thể đã bị kết tủa tại phần nhũ hóa giữa 2 pha do môi trường thiếu nước.

Hệ IPA - K₂HPO₄ cho thấy một hạn chế lớn về tính chọn lọc. Mặc dù khối lượng sản phẩm thu được ở pha trên là lớn nhất (2.8497 g), nhưng hàm lượng asiaticoside lại thấp nhất (chỉ 0.80%) với K = 0.83. Điều này hoàn toàn phù hợp do hệ này có TLL ngắn nhất, khả năng phân tách pha của hệ thống yếu, dẫn đến việc pha trên không chỉ kéo theo dung môi mà còn mang theo một lượng lớn các tạp chất phân cực từ cao nguyên liệu và muối từ pha dưới, làm pha loãng đáng kể hàm lượng hoạt chất mục tiêu.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã ứng dụng thành công hệ thống hai pha nước trong việc tinh chế và làm giàu asiaticoside từ cao đặc Rau má. Phương pháp này cho thấy nhiều ưu điểm so với kỹ thuật chiết xuất truyền thống như quy trình vận hành đơn giản, thời gian tách pha nhanh, đồng thời dung môi và muối có tiềm năng thu hồi để tái sử dụng [8].

Việc ứng dụng thành công phương trình Merckuk để mô hình hóa giản đồ pha với độ tin cậy cao (R²

> 0.995) giúp dự đoán khả năng tách pha, thành phần các pha lỏng, từ đó tạo tiền đề thuận lợi cho việc thiết kế và nâng cấp quy mô lên cỡ lô công nghiệp [9].

Tuy nhiên, nghiên cứu cũng chỉ ra hạn chế của hệ thống khi hàm lượng asiaticoside trong sản phẩm vẫn bị ảnh hưởng bởi tạp chất muối trong quy trình. Cụ thể, lượng muối tồn dư ở pha trên không bay hơi trong quá trình cô quay mà kết tinh lại, làm pha loãng độ tinh khiết của cao thành phẩm. Phát hiện này mở ra định hướng quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc tích hợp công đoạn xử lý nhằm khử muối hoàn toàn. Đồng thời, hệ thống cũng cần được tiếp tục khảo sát để tối ưu hóa các thông số vận hành như nhiệt độ, pH, lượng mẫu nạp và thời gian chiết xuất [10]. Đây là những bước tiến thiết yếu để hướng đến quy trình tinh chế asiaticoside đạt độ tinh khiết cao, đáp ứng các tiêu chuẩn khắt khe của ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được tiềm năng của hệ thống hai pha nước trong việc tinh chế chọn lọc asiaticoside từ cao đặc Rau má. Về mặt thực tiễn, phương pháp này thể hiện ưu điểm vượt trội về thời gian tách pha nhanh, thao tác đơn giản và thân thiện với môi trường. Kết quả hệ IPA - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cho hàm lượng asiaticoside trong sản phẩm sau tinh chế đạt 1.67%, tăng gấp 3.34 lần so với nguyên liệu ban đầu (0.50%), hệ số phân bố $K = 1.97$ và hiệu suất thu hồi đạt 66.30%. Đây chính là cơ sở dữ liệu nền tảng để triển khai các nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện vận hành (nhiệt độ, pH, tỷ lệ nạp mẫu) và tích hợp các bước xử lý thu hồi các thành phần (dung môi, muối) nhằm nâng cao hơn nữa độ tinh khiết, hướng tới sản xuất nguyên liệu dược liệu an toàn và chuẩn hóa ở quy mô công nghiệp.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài thuộc dự án nghiên cứu phát triển dược liệu của công ty TNHH Sản xuất Thương mại Hồng Đài Việt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Sun, L. Wu, Y. Wu, *et al.*, "Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 568032, 2020, DOI: 10.3389/fphar.2020.568032.
- [2] M. Kumar, D. Kumar, S. Mahmood, *et al.*, "Nanotechnology-driven wound healing potential of asiaticoside: a comprehensive review," *RSC Pharm.*, vol. 1, no. 1, pp. 9-36, 2024, DOI: 10.1039/d3pm00024a.
- [3] N. V. Hân, Đ. H. Nghị, B. T. T. Luyện và T. T. Biên, *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*. Hà Nội: NXB Y Học, tr. 49, 2022.
- [4] J. F. B. Pereira and J. A. P. Coutinho, "Aqueous Two-Phase Systems," in *Liquid-Phase Extraction*, C. F. Poole, Ed. Amsterdam: Elsevier, ch. 5, pp. 158-176, 2019.
- [5] S. C. Lo, R. N. Ramanan, B. T. Tey, *et al.*, "Liquid-Liquid Equilibrium of Alcohols + Ammonium/Potassium/Sodium Acetate + Water Systems: Experimental and Correlation," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 60, pp. 2848-2857, 2015, DOI: 10.1021/acs.jced.5b00200.
- [6] V. T. Nga, T. M. Tien, và H. M. Hao, "Extraction of Betacyanins from *Hylocereus polyrhizus* Peels Using Aqueous Two-Phase System," *J. Tech. Educ. Sci.*, vol. 18, no. Special Issue 01, pp. 8-16, 2023, DOI: 10.54644/jte.74.2023.1331.
- [7] J. A. Asenjo and B. A. Andrews, "Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 49, pp. 8826-8835, 2011, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.051.
- [8] A. C. R. Caldeira, W. F. L. de Franca, A. Converti, *et al.*, "Liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase ethanol/salt systems at different temperatures and their application to anthocyanins extraction," *Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 2, pp. 412-421, 2021, DOI: 10.1590/fst.32218.
- [9] J. C. Merchuk, B. A. Andrews, and J. A. Asenjo, "Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion," *J. Chromatogr. B*, vol. 711, pp. 285-293, 1998.
- [10] V. V. Tuấn, N. V. Minh, V. T. Trâm, và T. T. Biên, "Nghiên cứu hệ hai pha thân nước ứng dụng trong tinh chế rutin từ dịch chiết nụ hòe," *Tạp chí Dược học*, Tập 531, Số 60, Trang 84-88, 2020.