

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TRÍCH LY SAPONIN TỔNG VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA SÓNG SIÊU ÂM VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT TỪ SÂM BỐ CHÍNH (*Abelmoschus sagittifolius*)

**Phạm Thị Mỹ Tiên, Đinh Thị Hồng Thùy, Nguyễn Đăng Trường,
Trần Ngọc Danh, Trần Quốc Trung, Hồ Hiệp Thành,
Nguyễn Thị Thảo Minh, Trần Chí Hải***

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *haitc@hufi.edu.vn*

Ngày nhận bài: 26/7/2021; Ngày chấp nhận đăng: 08/9/2021

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, quá trình trích ly saponin tổng với sự hỗ trợ của siêu âm từ củ Sâm bố chính (*Abelmoschus sagittifolius*) đã được nghiên cứu. Phương pháp bề mặt đáp ứng được sử dụng để tối ưu các thông số của quá trình như thời gian siêu âm, công suất siêu âm và thời gian trích ly sau siêu âm. Sau đó, dịch trích được cô đặc chân không và xác định một số hoạt tính sinh học. Kết quả cho thấy tại điều kiện tối ưu, thời gian siêu âm 11,4 phút, công suất siêu âm 57,2 W/g và thời gian trích ly sau siêu âm 17,3 phút, hàm lượng saponin tổng đạt giá trị cực đại $2,577 \pm 0,056$ g/100 g. Giá trị này cao gấp 1,25 lần so với mẫu không xử lý siêu âm. Ngoài ra, kết quả chụp SEM cũng cho thấy siêu âm đã làm thay đổi cấu trúc tế bào của nguyên liệu ban đầu và hỗ trợ cho quá trình trích ly. Hơn nữa, cao chiết thu được có hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính ức chế α -amylase với giá trị IC_{50} lần lượt là 340,221 μ g/mL và 325,49 μ g/mL.

Từ khóa: Kháng oxy hóa, kháng α -amylase, Sâm bố chính, siêu âm, trích ly saponin tổng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm bố chính *Abelmoschus sagittifolius* từ lâu đã được dân gian sử dụng làm thuốc thảo dược để trị nhiều bệnh như suy nhược cơ thể, bệnh lao phổi, kém ăn gầy còm chậm lớn, ngăn chặn các tác nhân gây ra sốt và ho dai dẳng, viêm họng, viêm phế quản, kinh nguyệt không đều, đau lưng, đau mình, hoa mắt, chóng mặt. Chúng phân bố nhiều ở các vùng núi phía Bắc và được sử dụng đầu tiên tại Quảng Bình cách đây khoảng 300 năm [1].

Các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học và ứng dụng của Sâm bố chính ở trong và ngoài nước hiện còn hạn chế. Nhóm tác giả Đào Thị Vui và cộng sự (2008) đã công bố củ Sâm bố chính có nhiều hợp chất thứ cấp quan trọng như coumarin, flavonoid, đường khử, axit amin, axit hữu cơ, phytosterol, sesquiterpe, đặc biệt là saponin [2]. Ngoài ra, Nguyễn Thị Thu Hương và cộng sự (2006) đã công bố trong Sâm bố chính có chứa hợp chất saponin triterpen [3]. Saponin là một glycoside tự nhiên thường gặp trong nhiều loài thực vật [4]. Đây là một hợp chất có hoạt tính sinh học cao và tạo nên các tác dụng dược lý của Sâm bố chính.

Bên cạnh đó, kỹ thuật siêu âm được đánh giá là một biện pháp đơn giản và hiệu quả hơn phương pháp thông thường để chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ các bộ phận khác nhau của một số loại thực vật. Quá trình trích ly các chất có hoạt tính sinh học như saponin từ nhân sâm, gừng; rutin, axit carnosic từ cây hương thảo; polyphenol, axit amin và cafein từ trà

xanh, ... cho thấy khi sử dụng kỹ thuật siêu âm thì hiệu suất trích ly cao và thời gian xử lý ngắn hơn so với khi không được xử lý siêu âm [5].

Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của một số thông số công nghệ như công suất siêu âm, thời gian siêu âm và thời gian trích ly sau siêu âm đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính và bước đầu xác định một số hoạt tính sinh học của dịch cao chiết thu được như hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính kháng α -amylase.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguyên liệu:

Sâm bố chính (*Abelmoschus sagittifolius*) một năm tuổi dùng trong quá trình nghiên cứu được trồng tại Khu Nông Trường Việt Trung, huyện Bồ Trạch, tỉnh Quảng Bình; cung cấp bởi Công ty Cổ Phần Công Nghệ Quốc Tế Sâm Tiến Vua. Sâm tươi được rửa sạch, cắt lát có độ dày 1-2 mm, xếp đều trên khay và sấy ở nhiệt độ 50 °C đến độ ẩm không quá 10%. Thời gian sấy trung bình để đạt độ ẩm này từ 10-12 giờ. Kế đến, sâm đã sấy được nghiền và sàng qua rây 0,5 mm. Cuối cùng, bột qua rây được định lượng và chứa trong các túi zip trắng bạc 20 gram, hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ 4-8 °C [6-8].

2.1.2. Hóa chất:

Oleanolic axit 97%, Vitamin C 99%, Acarbose 95% có nguồn gốc từ Sigma-Aldrich, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 95%, tinh bột, KI 99%, Iodine 99% có xuất xứ từ Merck, enzyme α - amylase của hãng Novozyme – Đan Mạch. Các hóa chất khác đạt yêu cầu kỹ thuật hóa chất dùng trong phân tích.

2.1.3. Thiết bị:

Thiết bị siêu âm được sử dụng là thanh siêu âm VC 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, Mỹ) với tần số 20 KHz, cường độ siêu âm tối đa là 750 W. Thiết bị phát sóng siêu âm được trang bị gồm có 3 bộ phận: bộ phận chuyển phần lớn điện năng thành dòng điện xoay chiều tần số cao để vận hành bộ phận biến đổi; bộ phận biến đổi chuyển dòng điện xoay chiều tần số cao thành những dao động; hệ thống truyền sóng sẽ truyền những dao động vào trong lòng chất lỏng. Thiết bị cho phép cài đặt công suất đầu ra từ 20% - 100% so với công suất tổng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết

Bột sâm đã nghiền được cân chính xác 5,0 g, phối trộn với ethanol 70% theo tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:30 trong cốc thủy tinh. Trong quá trình trích ly, đồng thời thực hiện các khảo sát về ảnh hưởng của các thông số siêu âm đến khả năng trích ly saponin tổng. Kết thúc quá trình trích ly, toàn bộ dịch được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch trong ở trên được tiến hành xác định hàm lượng saponin tổng bằng phương pháp quang phổ so màu với thiết bị UV-VIS Jasco (Nhật).

2.2.2. Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến hàm lượng saponin tổng

Hỗn hợp được trích ly dưới sự hỗ trợ của siêu âm. Công suất siêu âm sẽ được thay đổi lần lượt là 0 (mẫu đối chứng không qua xử lý siêu âm); 45; 52,5; 60; 67,5 và 75 W/g với thời gian siêu âm là 10 phút, thời gian trích ly sau siêu âm 15 phút.

2.2.3. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng saponin tổng

Trong thí nghiệm này, thời gian siêu âm sẽ được thay đổi lần lượt từ 0 (mẫu đối chứng), 5, 10, 15 và 20 phút. Công suất siêu âm được lựa chọn từ kết quả thí nghiệm trước, thời gian trích ly sau siêu âm là 15 phút.

2.2.4. Ảnh hưởng của thời gian trích ly sau siêu âm đến hàm lượng saponin tổng

Hỗn hợp được tiến hành xử lý siêu âm với thời gian trích ly sau siêu âm lần lượt là 0, 5, 10, 15, 20 và 25 phút trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 50 °C. Công suất siêu âm và thời gian siêu âm được lựa chọn từ thí nghiệm trước.

2.2.5. Tối ưu hóa điều kiện xử lý bằng sóng siêu âm bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Quá trình tối ưu hóa ba yếu tố bằng phương pháp bề mặt đáp ứng Response Surface Design (RSD) với 6 thí nghiệm ở tâm, quy hoạch theo mô hình Central Composite Face (CCF) đã được tiến hành với sự hỗ trợ của phần mềm Mode 5.0. Các mức thí nghiệm được thể hiện qua bảng mã hóa (Bảng 1) với hàm mục tiêu là hàm lượng saponin tổng trong dịch trích ly (Y).

Bảng 1. Mã hóa các thông số tối ưu hóa

Các biến độc lập	Các giá trị được mã hóa		
	-1	0	1
Công suất siêu âm (X ₁), (W/g)	52,5	60	67,5
Thời gian siêu âm (X ₂), (phút)	5	10	15
Thời gian trích ly sau siêu âm (X ₃) (phút)	10	15	20

Mô hình dạng toàn phương bậc hai theo hàm lượng saponin tổng được xác định bằng hồi quy đa biến, có dạng:

$$Y = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{11}.X_1^2 + b_{22}.X_2^2 + b_{33}.X_3^2 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 \quad (1)$$

Với b₀; b₁; b₂; b₃; b₁₁; b₂₂; b₃₃; b₁₂; b₁₃; b₂₃ là hằng số, hệ số X₁; X₂; X₃; X₁²; X₂²; X₃²; X₁.X₂; X₁.X₃; X₂.X₃ tương ứng.

2.2.6. Chuẩn bị cao chiết từ Sâm bố chính

Phần dịch trong sau khi tiến hành trích ly với hỗ trợ của siêu âm ở điều kiện tối ưu được cô đặc trên thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50 °C, áp suất 150 mmHg để loại bỏ dung môi và thu được cao ethanol của Sâm bố chính đến khi giá trị hệ số cô đặc bằng 100, lúc này cao ethanol Sâm bố chính thu được có hàm lượng chất khô đạt yêu cầu chất lượng cao lỏng theo TCVN 11936:2015 [9]. Cao chiết thu được sẽ tiến hành xác định hoạt tính sinh học như khả năng kháng oxy hóa và khả năng kháng α-amylase.

2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

2.3.1. Xác định hàm lượng saponin tổng bằng phương pháp đo quang UV – VIS

Hàm lượng saponin tổng được xác định theo phương pháp của Hadidi và cộng sự (2020) với một số thay đổi [10]. Dịch chiết Sâm bố chính được pha loãng về nồng độ phù hợp và lấy 0,5 mL cho vào bình định mức, thêm lần lượt 0,2mL vanillin – axit acetic (5%), 1,2 mL HClO₄, ủ ở 70 °C trong bể điều nhiệt 30 phút và được làm lạnh nhanh trong 2 phút ngay sau đó, tiếp theo ethyl acetate được bổ sung sao cho tổng thể tích là 5mL. Cuối cùng, hỗn hợp được xác định độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm. Hàm lượng saponin tổng được xác định bằng

số gram acid Oleanolic có trong 100 gram chất khô nguyên liệu.

2.3.2. Xác định hàm lượng chất khô

Hàm lượng chất khô của dịch trích được xác định dựa trên nguyên tắc sấy khô đến khối lượng không đổi [11].

2.3.3. Xác định khả năng kháng oxy hoá

Phương pháp được thực hiện theo mô tả của Brand-Williams và cộng sự (1995) với một số cải tiến [12]. Hỗn hợp phản ứng gồm 1mL cao chiết ở các nồng độ khác nhau kết hợp với 5 mL dịch DPPH đã hiệu chỉnh sau đó lắc đều và giữ ổn định trong bóng tối, tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp được đo độ hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 517$ nm. Mẫu đối chứng Vitamin C ở các nồng độ khác nhau (4-20 $\mu\text{g/mL}$) được thực hiện tương tự như cao chiết.

Khả năng kháng oxy hóa được xác định dựa vào trị số IC_{50} , là giá trị nồng độ của dung dịch mà tại đó phần trăm ức chế đạt 50%, với phần trăm ức chế được xác định theo công thức (2).

$$\text{Phần trăm ức chế (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{trắng}} - \text{OD}_{\text{mẫu}}}{\text{OD}_{\text{trắng}}} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó, $\text{OD}_{\text{trắng}}$, $\text{OD}_{\text{mẫu}}$ lần lượt là độ hấp thụ của mẫu trắng (thay mẫu cao chiết bằng dung môi) và độ hấp thụ của mẫu cao chiết/mẫu đối chứng.

2.3.4. Xác định hoạt tính kháng α -amylase.

Hoạt tính kháng enzyme α -amylase được thực hiện theo phương pháp của Akkarachiyasit và cộng sự (2010) có điều chỉnh để phù hợp điều kiện phòng thí nghiệm [13]. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL enzyme α -amylase 0,5 U/mL, 1,0 mL dung dịch đệm phosphate pH 6,9 và 1,0 mL cao chiết ở các nồng độ khác nhau được ủ ở nhiệt độ 37 °C trong thời gian 10 phút. Kế đến, 2,5 mL dung dịch hồ tinh bột 1,0 mg/mL được cho thêm vào hỗn hợp trên và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung lần lượt 1 mL HCl 1N và 3 mL thuốc thử Iodine 0,1N. Cuối cùng, phức màu được đo độ hấp thụ tại bước sóng $\lambda = 660$ nm để xác định lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Với mẫu đối chứng Acarbose, quá trình được thực hiện tương tự như đối với mẫu cao chiết Sâm bố chính. Acarbose ở nồng độ khác nhau (4-20 $\mu\text{g/mL}$) được sử dụng như chất chuẩn. Khả năng kháng α -amylase được xác định dựa vào trị số IC_{50} với công thức tính tương tự như xác định khả năng kháng oxy hóa.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

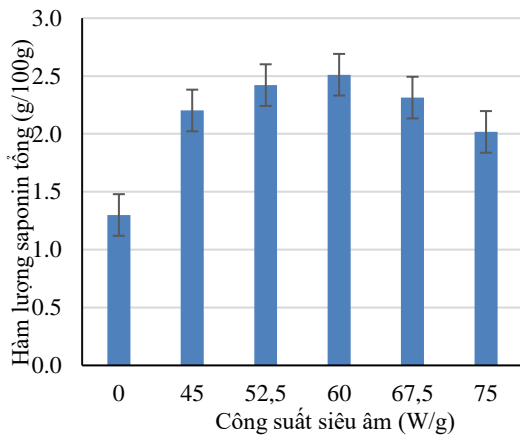
Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Phân tích phương sai một nhân tố và kiểm định LSD để đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa 5% được tiến hành bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2019 và phần mềm phân tích số liệu Statgraphics Centurion XV. Quá trình tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng được thực hiện bằng phần mềm Mode 5.0 (Sartorius Stedim Biotech Company).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

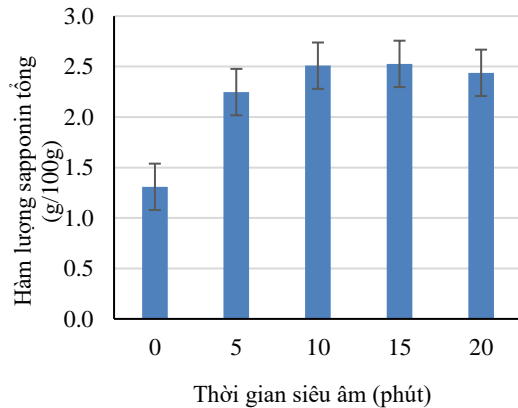
3.1. Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính

Hình 1 cho thấy công suất siêu âm đã có tác động hỗ trợ tích cực đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính. Cụ thể, mẫu không xử lý siêu âm có hàm lượng saponin tổng chỉ đạt $1,299 \pm 0,012$ g/100 g; trong khi đó, mẫu xử lý siêu âm công suất 60 W/g có hàm lượng

saponin tổng cao nhất tăng gấp 1,93 lần so với mẫu không siêu âm và gấp 1,14 lần so với mẫu xử lý ở công suất 45 W/g. Điều này được giải thích là do tác động của sóng siêu âm sẽ làm tăng tốc độ dịch chuyển của các phân tử saponin, làm tăng khả năng tiếp xúc giữa các phân tử saponin với dung môi. Vì thế, điều này làm tăng cường sự truyền khối, đối lưu và thúc đẩy xảy ra sự khuếch tán, góp phần tăng hiệu suất quá trình trích ly [14]. Đồng thời, dưới tác dụng của sóng siêu âm các bọt khí bị kéo nén làm các bọt khí nổ vỡ, nên cấu trúc tế bào bị phá vỡ một phần, giúp các chất trong tế bào dễ dàng thoát ra ngoài, trong đó có saponin [15]. Tuy nhiên, khi công suất siêu âm tăng cao có thể làm tăng nhiệt độ trong lòng dung môi làm thúc đẩy các biến đổi hóa học của saponin, từ đó làm giảm hàm lượng [16]. Vì thế, khi công suất siêu âm tiếp tục tăng đến 75 W/g thì hàm lượng saponin tổng có xu hướng giảm còn $2,017 \pm 0,067$ g/100 g. Kết quả nghiên cứu của Zhao và cộng sự (2007) trên đối tượng sài hồ (*Bupleurum chinense* DC) cũng cho kết quả tương tự. Khi tăng công suất siêu âm từ 0-26 W/g thì cho hàm lượng saikosaponin tổng tăng và đạt giá trị cao nhất tại công suất 21 W/g, tăng 33% so với mẫu không xử lý siêu âm. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng công suất từ 26-32 W/g thì hiệu suất trích ly không tăng và có xu hướng giảm [17]. Kết quả nghiên cứu cũng tương tự nghiên cứu của Hadidi và cộng sự (2020) khi nghiên cứu trích ly saponin tổng từ cỏ linh lăng (*Medicago sativa*) với sự hỗ trợ sóng siêu âm, kết quả cho thấy khi tăng công suất siêu âm từ 50 W đến 100 W hàm lượng saponin tổng tăng, tuy nhiên khi tiếp tục tăng công suất lên 150 W thì hàm lượng giảm [10]. Dựa vào kết quả về hàm lượng saponin tổng, công suất siêu âm 60 W/g được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp.



Hình 1. Ảnh hưởng công suất siêu âm đến hàm lượng saponin tổng



Hình 2. Ảnh hưởng thời gian siêu âm đến hàm lượng saponin tổng

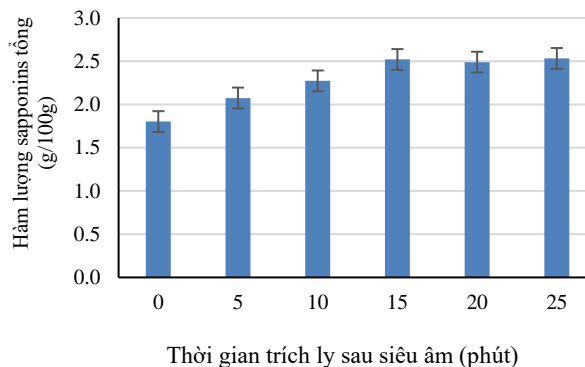
3.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính

Thời gian siêu âm càng dài thì hàm lượng saponin tổng cũng tăng theo (Hình 2). Với thời gian xử lý 10 phút, hàm lượng saponin tổng đạt $2,509 \pm 0,058$ g/100 g, cao gấp 1,92 lần so với mẫu đối chứng không siêu âm. Tại các mốc thời gian 15 phút, 20 phút hàm lượng saponin tổng thay đổi không có sự khác biệt so với thời điểm xử lý 10 phút. Trên lý thuyết, thời gian siêu âm càng dài, các biến đổi của nguyên liệu càng sâu sắc. Kéo dài thời gian xử lý siêu âm đồng nghĩa với việc gia tăng thời gian tác động của sóng siêu âm lên nguyên liệu đem trích ly. Việc kéo dài thời gian làm gia tăng các tác động nén dẫn lên các tế bào chất chiết và làm cho sự biến đổi của nguyên liệu diễn ra mạnh mẽ hơn. Các tế bào có thể bị phá vỡ với tỷ lệ cao hơn khi mà thời gian xử lý siêu âm kéo dài, do đó hiệu suất trích ly sẽ tăng [18]. Tuy nhiên, nếu thời gian xử lý quá dài có thể làm biến đổi thành phần các chất chiết, do đó làm giảm hàm lượng saponin tổng thu được [16]. Kết quả nghiên cứu của Xiang và cộng sự (2010) khi nghiên cứu trích ly saponin từ trà cũng cho kết quả tương tự. Thời gian siêu âm thay đổi từ 5 phút đến

30 phút thì hàm lượng saponin tăng, tuy nhiên hàm lượng saponin giảm khi thời gian siêu âm tiếp tục tăng đến các mức nghiệm thức 35, 40 và 45 phút [18]. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Sun và cộng sự (2021) khi nghiên cứu chiết saponin từ lá cây táo tàu (*Zizyphus jujuba Mil var. spinosa*) với sự hỗ trợ của siêu âm. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng saponin tăng khi tăng thời gian chiết và đạt giá trị cao nhất tại 50 phút, tuy nhiên tiếp tục tăng lên 60 và 70 phút thì hàm lượng saponin có xu hướng giảm [19]. Dựa vào kết quả về hàm lượng saponin tổng, thời gian siêu âm 10 phút được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian trích ly sau xử lý siêu âm đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính.

Hình 3 cho thấy thời gian trích ly sau siêu âm có tác động đến quá trình trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính. Thời gian trích ly sau siêu âm tăng từ 5 đến 15 phút thì hàm lượng saponin tổng tăng lần lượt là 1,15 và 1,40 lần so với mẫu đối chứng $2,075 \pm 0,054$ g/100 g và $2,520 \pm 0,074$ g/100 g; song, khi tăng thời gian trích ly tăng lên 20 phút, 25 phút thì hàm lượng saponin tổng thu được có xu hướng đạt cân bằng và không có sự khác biệt với mức ý nghĩa 5% ($2,489 \pm 0,026$ g/100 g và $2,532 \pm 0,051$ g/100 g). Điều này có thể là do hàm lượng saponin tổng tăng dần theo thời gian đến trạng thái cân bằng thì không tăng thêm. Quy luật này cũng tìm được trong nghiên cứu của Wei và cộng sự (2015) khi xác định điều kiện tối ưu để chiết saponin triterpenoid từ lá *Jatropha curcas* với sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Kết quả cho thấy khi thời gian trích ly tăng từ 10 phút đến 40 phút thì hàm lượng saponin triterpenoid tăng nhiều từ 12,5 (mg/g chất khô) đến 18,93 (mg/g chất khô). Tuy nhiên, không có sự thay đổi đáng kể khi tiếp tục tăng thời gian trích ly từ 40 đến 60 phút. Tác giả cũng giải thích rằng thời gian trích ly dài có thể dẫn tới sự phân hủy các hợp chất triterpenoid [20]. Dựa vào kết quả về hàm lượng saponin tổng, thời gian trích ly sau siêu âm 15 phút được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp.



Hình 3. Ảnh hưởng thời gian trích ly sau siêu âm đến hàm lượng saponin tổng

3.4. Tối ưu hóa các thông số trong trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính

Từ kết quả quy hoạch thực nghiệm trong Bảng 2, số liệu được xử lý và trình bày trong Bảng 3. Vì hai hệ số đứng trước X_2^2 và X_{23} không có ý nghĩa về mặt thống kê (P -value > 0,05) nên chúng bị loại ra khỏi phương trình hồi quy; các hệ số còn lại thay vào phương trình (1) và thu được phương trình (3).

$$Y_1 = 2,579 - 0,083.X_1 + 0,083.X_2 + 0,134.X_3 - 0,205.X_1^2 - 0,073.X_3^2 - 0,059.X_{12} + 0,048.X_{13} \quad (3)$$

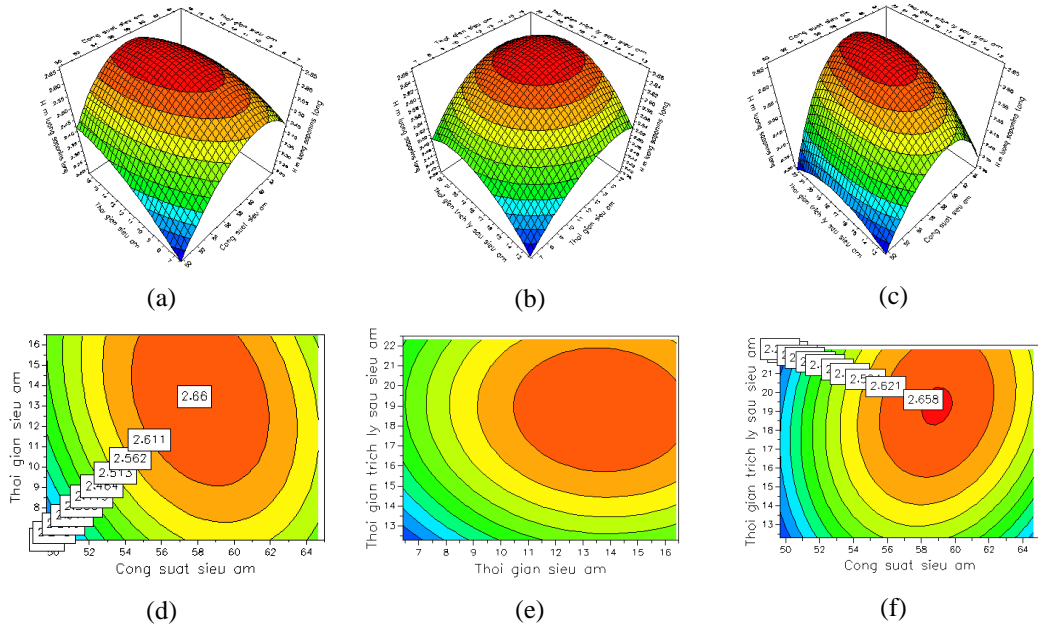
Bảng 2. Bảng ma trận quy hoạch thực nghiệm và kết quả

Số TN	Biến mã hóa			Biến thực			Hàm lượng saponin tổng (g/100 g)
	X ₁	X ₂	X ₃	Công suất siêu âm (W/g)	Thời gian siêu âm (phút)	Thời gian trích ly sau siêu âm (phút)	
1	-1	-1	-1	52,5	5	10	2,048 ± 0,027
2	1	-1	-1	67,5	5	10	1,967 ± 0,065
3	-1	1	-1	52,5	15	10	2,425 ± 0,050
4	1	1	-1	67,5	15	10	1,954 ± 0,049
5	-1	-1	1	52,5	5	20	2,311 ± 0,061
6	1	-1	1	67,5	5	20	2,263 ± 0,058
7	-1	1	1	52,5	15	20	2,509 ± 0,074
8	1	1	1	67,5	15	20	1,985 ± 0,046
9	-1	0	0	52,5	10	15	2,427 ± 0,048
10	1	0	0	67,5	10	15	2,342 ± 0,045
11	0	-1	0	60	5	15	2,375 ± 0,029
12	0	1	0	60	15	15	2,577 ± 0,035
13	0	0	-1	60	10	10	2,369 ± 0,048
14	0	0	1	60	10	20	2,638 ± 0,055
15	0	0	0	60	10	15	2,607 ± 0,053
16	0	0	0	60	10	15	2,528 ± 0,053
17	0	0	0	60	10	15	2,632 ± 0,053
18	0	0	0	60	10	15	2,568 ± 0,053
19	0	0	0	60	10	15	2,511 ± 0,053
20	0	0	0	60	10	15	2,636 ± 0,053

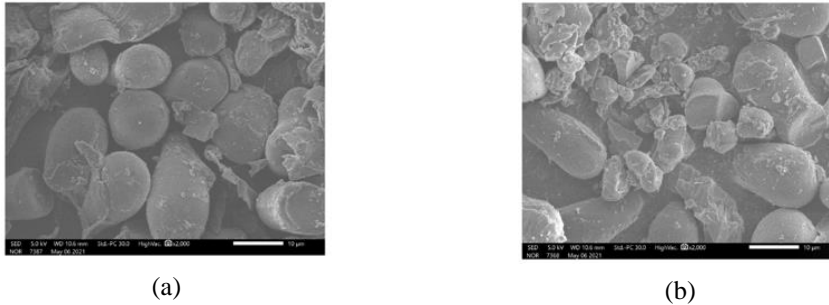
Bảng 3. Kết quả hồi quy đa biến hàm lượng saponin tổng

Hệ số hồi quy	Coeff. SC	Std. Err.	P - value	Conf. int(±)
b ₀	2,579	0,018	7,529e-018	0,041
b ₁	-0,083	0,017	0,0006	0,037
b ₂	0,083	0,017	0,0006	0,037
b ₃	0,134	0,017	1,150e-005	0,037
b ₁₁	-0,205	0,032	7,709e-005	0,071
b ₂₂	-0,069	0,032	0,057	0,071
b ₃₃	-0,073	0,032	0,045	0,071
b ₁₂	-0,059	0,019	0,010	0,042
b ₁₃	0,048	0,019	0,029	0,042
b ₂₃	-0,006	0,019	0,736	0,042

Theo Gabrielsson và cộng sự (2002), mô hình thí nghiệm đáng tin cậy là khi giá trị biến thiên ảo $Q^2 > 0,5$ và hệ số biến thiên thực R^2 nằm trong khoảng 0,80 - 0,97 [21]. Kết quả thực nghiệm có giá trị $Q^2 = 0,641$ và $R^2 = 0,967$ cho thấy mô hình hồi quy là phù hợp và đáng tin cậy. Phương trình hồi quy được biểu diễn trên trục tọa độ không gian ba chiều và hai chiều như Hình 4.



quả chụp SEM mẫu sau khi xử lý siêu âm (Hình 5b) lại thể hiện các tế bào của mô thực vật bị phá vỡ và bị biến dạng.



Hình 5. Hình SEM của bột Sâm bổ chính sau khi trích ly bằng dung môi (a) và sau khi trích ly có hỗ trợ siêu âm (b)

Kết quả này tương tự nghiên cứu của Ivanova và cộng sự (2010) khi tiến hành đánh giá hiệu quả của quá trình trích ly saponin và rutin bằng sóng siêu âm trong cây tật lê (*Tribulus terrestris* L). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng quá trình trích ly saponin bằng sóng siêu âm giúp giảm thời gian trích ly, tiết kiệm dung môi và hiệu quả hơn so với phương pháp trích ly nhiệt ngược dòng truyền thống (heat reflux). Mẫu trích ly với điều kiện siêu âm trong 2 giờ, dung môi acetone, nhiệt độ phòng, thu được hàm lượng saponin và rutin đạt 1,51% cao hơn 1,64 lần so với trích ly bằng phương pháp truyền thống [22]. Một nghiên cứu khác của Kadir và cộng sự (2010) tiến hành trích ly triterpenoid saponin từ lá cây *Ceriops Decandra* sp bằng phương pháp siêu âm và so sánh với phương pháp chiết soxlet thì nhận thấy rằng trích ly có hỗ trợ siêu âm chỉ cần 15 phút để đạt được hàm lượng triterpenoid saponin cao nhất 0,9972%, trong khi đó phương pháp khác cần vài giờ thậm chí hơn 3 giờ để đạt được hiệu suất cao nhất [23]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Wu và cộng sự (2001) khi tiến hành trích ly saponin từ nhân sâm cho thấy trong tất cả các trường hợp thì hàm lượng saponin ở 2 giờ đầu khi trích ly bằng phương pháp sử dụng sóng siêu âm (cả trực tiếp và gián tiếp) đều cao hơn 50-100% so với phương pháp soxhlet và bằng với hàm lượng saponin thu được sau 8 giờ khi trích ly bằng phương pháp soxhlet. Điều này có nghĩa là tốc độ trích ly saponin bằng sóng siêu âm nhanh gấp 3 lần so với khi dùng soxhlet [24]. Vì vậy, từ kết quả so sánh trên cho thấy rằng phương pháp trích ly có hỗ trợ sóng siêu âm có những ưu điểm vượt trội hơn so với trích ly theo phương pháp truyền thống như là tiết kiệm thời gian, tiết kiệm dung môi và đạt hiệu suất trích ly cao hơn.

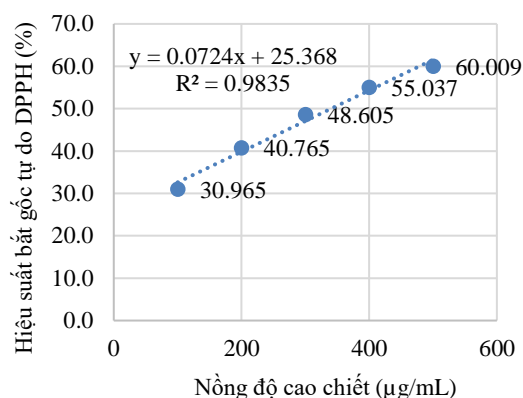
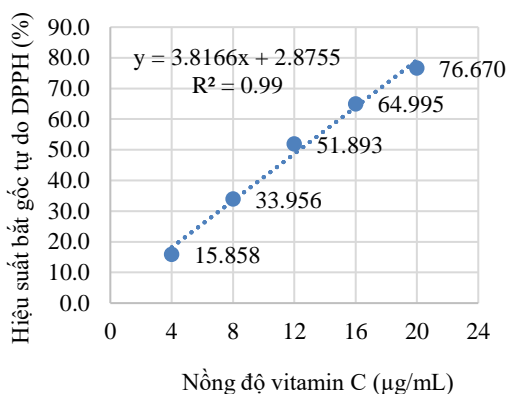
3.5. Đánh giá hoạt tính sinh học cao chiết từ Sâm bổ chính

Dịch chiết Sâm bổ chính sau khi được trích ly ở điều kiện tối ưu hóa với sự hỗ trợ sóng siêu âm được cô quay chân không ở nhiệt độ 50 °C, áp suất 150 mmHg, tốc độ quay 40 vòng/phút để đuổi dung môi và tăng hàm lượng chất khô đạt trên 60% theo TCVN 11936:2017/BYT quy định đối với các sản phẩm cao chiết từ nhân sâm [9]. Cao chiết Sâm bổ chính có hàm lượng chất khô tổng đạt 70,1% và hàm lượng saponin tổng là 52,31 mg/g cao chiết. Sau đó, chế phẩm cao chiết ethanol được xác định hoạt tính kháng oxy hóa và kháng kháng α -amylase.

3.5.1. Khả năng kháng oxy hóa

Trong khoảng nồng độ khảo sát tương ứng nồng độ Vitamin C (4-20 $\mu\text{g/mL}$) và nồng độ mẫu cao chiết Sâm bổ chính (100-500 $\mu\text{g/mL}$), khả năng kháng oxy hóa tỷ lệ thuận với nồng độ dung dịch. Phương trình hồi quy bậc nhất Vitamin C và cao chiết Sâm bổ chính lần lượt là $y = 3,8166x + 2,8755$ ($R^2 = 0,9900$) và $y = 0,0724x + 25,368$ ($R^2 = 0,9835$) có độ tin cậy cao. Kết quả cho thấy khả năng kháng oxy hóa của cao chiết Sâm bổ chính là khá cao, giá trị IC_{50}

đạt 340,221 $\mu\text{g/mL}$, tuy nhiên hiệu quả này thấp hơn xấp xỉ 26 lần so với khả năng chống oxy hóa của Vitamin C (IC_{50} của Vitamin C là 12,347 $\mu\text{g/mL}$). Điều này là do trong cao chiết không chỉ gồm các thành phần có khả năng kháng oxy hóa mà còn có các hợp chất khác như carbohydrate.

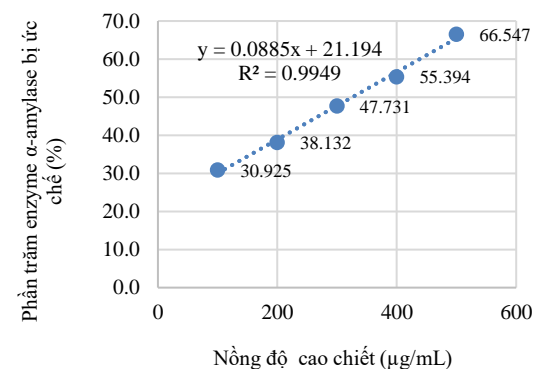
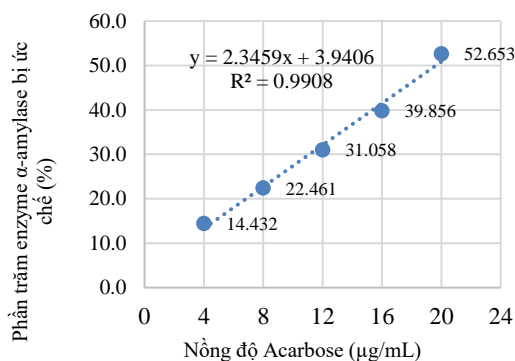


Hình 6. Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH của Vitamin C

Hình 7. Hiệu suất bắt gốc tự do DPPH của cao chiết

3.5.2. Khả năng kháng α -amylase

Cũng tương tự như khả năng kháng oxy hóa, trong khoảng nồng độ khảo sát của Acarbose (4-20 $\mu\text{g/mL}$) và cao chiết Sâm bố chính (100-500 $\mu\text{g/mL}$), phần trăm enzyme α -amylase bị ức chế tăng tuyến tính với nồng độ. Phương trình hồi quy bậc nhất tương ứng với Acarbose và Sâm bố chính lần lượt là $y = 2,3459x + 3,9406$ ($R^2 = 0,9908$) và $y = 0,0885x + 21,194$ ($R^2 = 0,9949$) có độ tin cậy cao. Giá trị IC_{50} của mẫu Acarbose ($\text{IC}_{50} = 19,63 \mu\text{g/mL}$) cao gấp xấp xỉ 16 lần so với mẫu cao chiết Sâm bố chính ($\text{IC}_{50} = 325,49 \mu\text{g/mL}$). Enzyme α -amylase là một enzyme thực hiện bước đầu tiên trong quá trình thủy phân tinh bột, việc làm ức chế enzyme này sẽ dẫn tới một loạt các enzyme biến dưỡng carbohydrate hoạt động sau đó cũng đình trệ. Điều này sẽ hạn chế sự tạo thành glucose sau bữa ăn, giúp người bệnh đái tháo đường ổn định đường huyết. Vì vậy, cao chiết ethanol từ Sâm bố chính có tiềm năng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường thông qua việc ức chế khả năng hoạt động của enzyme α -amylase.



Hình 8. Khả năng ức chế α -amylase của Acarbose

Hình 9. Khả năng ức chế α -amylase của cao chiết

2. KẾT LUẬN

Phương pháp trích ly có hỗ trợ của siêu âm được sử dụng để nâng cao hiệu quả trích ly saponin tổng từ Sâm bố chính. Khi sử dụng hỗ trợ siêu âm, hàm lượng saponin tổng có thể đạt cực đại và tăng 20,14% so với mẫu trích ly không hỗ trợ siêu âm do tác dụng làm phá

vỡ và biến dạng tế bào nguyên liệu của siêu âm. Điều kiện tối ưu khi trích ly có hỗ trợ siêu âm là công suất 57,2 W/g, thời gian siêu âm 11,4 phút và thời gian trích ly sau siêu âm 17,3 phút; tại điều kiện này, hàm lượng saponin tổng đạt $2,577 \pm 0,056$ g/100 g. Cao chiết Sâm bố chính có khả năng kháng oxy hóa và khả năng ức chế α -amylase khá cao. Vì vậy, Sâm bố chính là một nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng có thể được ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi - Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội (2004) tr. 813-815.
2. Đào Thị Vui - Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược lý theo hướng điều trị loét dạ dày của rễ củ cây sâm báo (*Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr. Họ Bông (*Malvaceae*)," Luận án Tiến sĩ Dược học, Viện dược liệu, Hà Nội (2008).
3. Nguyễn Thị Thu Hương - Một số tác dụng dược lý của sâm Bố Chính và thập tử Harmand thu hái ở Lộc Ninh, Bình Phước, Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học và công nghệ (2006) tr. 90-91.
4. Francis G., Kerem Z., Makkar H. P., & Becker K. - The biological action of saponins in animal systems: a review, *British journal of Nutrition* **88** (6) (2002) 587- 605.
5. Vilku K., Mawson R., Simons L. & Bates D. - Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9** (2) (2008) 161-169.
6. Phạm Thanh Kỳ - Dược liệu học tập 1, NXB Trường đại học Thành Đô, Hà Nội (2011) 34-37.
7. Zhang S., Chen R., Wu H., & Wang C. - Ginsenoside extraction from *Panax quinquefolium* L. (*American ginseng*) root by using ultrahigh pressure, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41** (1) (2006) 57-63.
8. Cho C. W., Kim S. W., Rho J. H., Rhee K. H. & Kim K. T. - Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size, *Journal of Ginseng Research* **32** (6) (2008) 179-186.
9. TCVN 11936:2015 - Sản phẩm nhân sâm, Bộ Khoa học và Công nghệ (2017).
10. Hadidi M., Ibarz A. & Pagan J. - Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology, *Food Chemistry* **309** (2020) 125786.
11. TCVN 7729:2007 - Xác định độ ẩm sữa bột, Bộ Y tế (2007).
12. Brand-Williams W., Cuvelier M. E, & Berset C. - Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology* **28** (1) (1995) 25-30.
13. Akkarachiyasit S., Charoenlertkul P., Yibchok-Anun S. & Adisakwattana S. - Inhibitory activities of cyanidin and its glycosides and synergistic effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase, *International journal of molecular sciences* **11** (9) (2010) 3387-3396.
14. Kuldiloke J. - Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices (2002) 5-8.
15. Suslick K. S. - Sonochemistry, *science* **247** (4949) (1990) 1439-1445.
16. Ji J. B., Lu X. H., Cai M. Q. & Xu X. C. - Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* **13** (5) (2006) 455-462.
17. Zhao S., Kwok K. C. & Liang H. - Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*, *Separation and Purification Technology* **55** (3) (2007) 307-312.

18. Xiang L., Jian-zhong M., Jing X. & Yun-dong S. - A study on the extraction and purification technology of tea saponin, *African Journal of Biotechnology* **9** (18) (2010) 2691-2696.
19. Sun Y., Zhang Y., Qi W., Xie J. & Cui X. - Saponins extracted by ultrasound from *Zizyphus jujuba* Mil var. *spinosa* leaves exert resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*, *Journal of Food Measurement and Characterization* **15** (1) (2021) 541-554.
20. Wei L., Zhang W., Lin L., Yan F., Xu Y. & Chen F. - Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities, *Electronic Journal of Biotechnology* **18** (2) (2015) 88-95.
21. Gabrielsson J., Lindberg N. O. & Lundstedt T. - Multivariate methods in pharmaceutical applications, *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* **16** (3) (2002) 141-160.
22. Ivanova A., Lazarova I., Mechkarova P. & Tchorbanov B. - HPLC method for screening of steroidal saponins and rutin as biologically active compounds in *Tribulus terrestris* L, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **24** (1) (2010) 129-133.
23. Kadir M. T. F. A. - Extraction of mangrove component for isolation of triterpenoid saponins via ultrasonic extraction method, UMP (2010).
24. Wu J., Lin L. & Chau F. T. - Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrasonics sonochemistry* **8** (4) (2001) 347-352.

ABSTRACT

ULTRASOUND - ASSISTED TOTAL SAPONINS EXTRACTION AND ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *Abelmoschus sagittifolius*

Pham Thi My Tien, Dinh Thi Hong Thuy, Nguyen Dang Truong,
Tran Ngoc Danh, Tran Quoc Trung, Ho Hiep Thanh,
Nguyen Thi Thao Minh, Tran Chi Hai*
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: haitc@hufi.edu.vn

In this study, the ultrasound-assisted extraction of total saponins from *Abelmoschus sagittifolius* was presented. The response surface methodology was used to optimize the extraction conditions including sonication time, ultrasound power, and extraction time after sonication. The extracts were then condensed by a vacuum evaporator system and their biological activities were determined. The results showed that the optimal conditions included sonication time of 11.4 min, ultrasound power of 57.2 W/g and extraction time after ultrasound treatment of 17.3 min. Under this optimum condition, the amount of total saponins obtained was 2.577 ± 0.056 g/100g, which was 1.25 times higher than that from the samples without ultrasonic treatment. Additionally, the SEM images proved that the ultrasonic treatment changed the cell structure of raw material and supported the total saponins extraction process. Moreover, the concentrated extract exhibited strong antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity with IC_{50} values of 340.221 (μ g/mL) for the DPPH radical scavenging activity and 325.49 (μ g/mL) for α -amylase inhibitory capacity.

Keywords: Antioxidant activity, α -amylase inhibition capacity, *Abelmoschus sagittifolius* Ginseng, ultrasound, total saponin extraction.