

TỐI ƯU HÓA CÁC THÔNG SỐ TÁCH CHIẾT POLYSACCARIT VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ RỄ CÂY SÂM XUYÊN ĐÁ (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume)

Lưu Hồng Sơn¹, Vũ Thị Hạnh², Nguyễn Thị Tinh¹,
Tạ Thị Lượng^{1,3}, Đinh Thị Kim Hoa^{1*}, Ngô Xuân Bình^{1,4}

¹Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Đại học Queensland; ⁴Bộ Khoa học và Công nghệ

*Tác giả liên hệ: dingthikimhoa@tuaf.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.02.2021

Ngày chấp nhận đăng: 04.06.2021

TÓM TẮT

Sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume) đã được chứng minh chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như polysaccharit, saponin, flavonoid. Nghiên cứu này xác định ảnh hưởng của đơn yếu tố đến quá trình chiết xuất, làm cơ sở thực hiện tối ưu chiết xuất. Dịch chiết thu nhận được đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hóa và chống viêm. Kết quả đơn yếu tố khi chiết xuất polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá là thời gian siêu âm 60 giây ở tần số 37kHz, ethanol 80%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 15/1 (ml/g), thời gian chiết 90 phút, nhiệt độ chiết 80°C. Điều kiện tối ưu chiết xuất polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá là: siêu âm 64,67 giây ở tần số 37kHz; ethanol 81,56%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 15,33/1 (ml/g), thời gian chiết 90 phút, nhiệt độ 80°C, hàm lượng polysaccharit đạt 16,1948 mg/g rễ cây. Dịch chiết từ rễ sâm xuyên đá có khả năng ức chế các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* K; *Staphylococcus aureus*; *Shigella flexneri*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas spp* và *Salmonella spp*. với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng: 8,01; 18,06; 8,03; 6,84; 15,33; 9,39 và 10,13mm. Giá trị IC₅₀ là 168,94 ± 5,28 (µg/ml) khi đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa. Khả năng chống viêm lần lượt là 28,31 ± 1,04; 33,76 ± 1,06; 50,04 ± 2,03; 71,14 ± 2,81 (% biến tính BSA) tương ứng với nồng độ cao chiết 0,78125; 1,5625; 3,125; 6,350 (µg/ml).

Từ khóa: Tối ưu, thông số, sâm xuyên đá, polysaccharit, Thái Nguyên.

Optimization of Parameters in Polysaccharide Extraction and Bioactive Analysis from *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume Roots

ABSTRACT

It has been demonstrated that roots of *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) contain many bioactive compounds including polysaccharides, saponin, flavonoids. This study aimed to determine the effects of the single-factor model on the amount of polysaccharide extracted from roots of *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume), as a basis on a fractional factorial design at three levels through the Box–Behnken experimental design. Extracts obtained from optimized conditions were used for evaluation of their antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory ability. The results of the single-factor showed that the time of using ultrasound, the ethanol concentration, solvent/ material ratio, and extraction temperature were 60 seconds at 37 kHz, 80%, 15/1 (ml/g), and 80°C for 90 min respectively. Under the optimized conditions by using the Box–Behnken experimental design, the results showed that the time of using ultrasound, the ethanol concentration, solvent/ material ratio, and extraction temperature were 64.67 seconds at 37 kHz, 81.56%, 15.33/1 (ml/g), and 80°C for 90 min respectively; and the total polysaccharide content was 16.1948 mg/g of the root. The extracts of total polysaccharides were able to inhibit *Staphylococcus aureus* K, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp* with antibacterial ring diameters as follow: 8.01; 18.06; 8.03; 6.84; 15.33; 9.39, and 10.13 mm respectively. There was an IC₅₀ value of 168.94 ± 5.28 (µg/ml) when evaluating antioxidant activity. The anti-inflammatory ability was 28.31 ± 1.04; 33.76 ± 1.06; 50.04 ± 2.03 and 71.14 ± 2.81 (% BSA denaturation) corresponds to the extract concentration of 0.78125; 1.5625; 3.125 and 6.350 (µg/ml) respectively.

Keywords: Optimization, parameters, *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume, polysaccharide, Thai Nguyen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, trên thế giới, đặc biệt là tại Ấn Độ, đã có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần hóa học trên lá và một số công bố liên quan đến rễ của *Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume với tên thường gọi là sâm Xuyên Đá (Praveen & cs., 2014; Damaso & cs., 2020). Sâm Xuyên Đá có khả năng mọc xuyên qua đá (xuyên phá thạch) là loại thảo dược quý. Trên thế giới loại cây này phân bố ở các vùng Hải Nam (Trung Quốc), Bangladesh, Campuchia, Ấn Độ, Lào, Myanmar, Thái Lan, quần đảo Andaman và Nicobar. Tại Việt Nam, cây này mọc ở rừng già, khe núi đá vôi khu vực Tây Bắc như Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu, Thái Nguyên, Yên Bái. Hoạt tính sinh học chủ yếu của sâm Xuyên Đá được chứng minh có liên quan đến hợp chất polysaccarit của chúng nhờ khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, giảm lượng đường huyết, giảm mỡ máu, chống béo phì, kháng ung thư, chống tăng huyết áp (Bùi Hồng Quang & cs., 2011).

Chiết xuất hoạt chất sinh học từ thực vật sẽ làm tăng nồng độ chất quý, chủ động hơn trong việc bào chế, tạo ra các sản phẩm thương mại sau này. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết như vi sóng, siêu âm, dung môi, nhiệt độ, thời gian, số lần chiết... Hiện nay, chiết xuất hoạt chất nhờ hỗ trợ của sóng siêu âm được các nhà khoa học quan tâm nhờ thời gian chiết xuất ngắn, hiệu suất chiết xuất cao nhờ khả năng bẻ gãy các liên kết hóa học, phá vỡ tế bào (Trần Hữu Danh & cs., 2017). Tuy nhiên, để đạt hiệu suất chiết cao, cần quan tâm ảnh hưởng của nhiều yếu tố. Damaso & cs. (2020) cho thấy dung môi ethanol 85%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 15/1 (ml/g), thời gian 120 phút ở 90°C nhiệt độ chiết cho thu nhận polysaccarit từ thân sâm Xuyên Đá cho kết quả tốt nhất là 9,34 mg/g. Phạm Bảo Trương & Nguyễn Minh Thủy (2015) lựa chọn dung môi nước với tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu là 50/1 (ml/g), thời gian chiết 30 phút và nhiệt độ chiết 130°C để thu nhận polysaccarit từ nấm linh chi đỏ. Mục đích nghiên cứu là xác định điều kiện

thu nhận dịch chiết có hàm lượng polysaccarit cao và đánh giá khả năng kháng khuẩn, kháng oxy hoá, kháng viêm từ rễ cây sâm Xuyên Đá trồng tại Thái Nguyên. Dựa trên các kết quả đã công bố, trong nghiên cứu này sử dụng dung môi ethanol trong khoảng 60-96%; tỉ lệ dung môi chiết/ nguyên liệu 5/1-20/1 (ml/g), thời gian từ 30-120 phút và nhiệt độ chiết 60-90°C dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm trong khoảng 0-90 giây ở tần số 37kHz. Việc giảm bớt thông số ít ảnh hưởng để thực hiện bài toán tối ưu giúp quá trình thực hiện thí nghiệm thuận tiện hơn mà không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả thu nhận polysaccarit. Ba yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết được lựa chọn tối ưu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken (Box & cs., 1951). Dịch chiết sau quá trình tối ưu hoá được đánh giá về kháng khuẩn, hoạt tính kháng oxy hoá và khả năng chống viêm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume) được thu hái vào sáng sớm của tháng 10 trong năm tại xã La Hiên, huyện Võ Nhai, tỉnh Thái Nguyên. Mẫu nghiên cứu được định danh kết luận loài tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội theo phương pháp hình thái so sánh. Phần rễ cây phát triển từ hạt 2 năm tuổi được sử dụng để phân tích. Nguyên liệu rễ sâm Xuyên Đá được rửa sạch bùn đất và loại bỏ phần hư dập. Toàn bộ nguyên liệu được thái lát mỏng và làm khô bằng sấy đối lưu tự nhiên bằng tủ sấy Memmert UN110Plus - Đức đến độ ẩm 10-12%. Sau đó, nguyên liệu được nghiền nhỏ về kích thước $2 < d \leq 3$ mm, bảo quản trong túi PE đặt trong hộp nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng và ẩm.

Các hóa chất và môi trường được sử dụng trong thí nghiệm: ethanol (EtOH), phenol của Merck - Đức (dạng tinh khiết), H₂SO₄ đậm đặc (Việt Nam); hóa chất được sử dụng trong chiết xuất và phân tích đạt tiêu chuẩn PA.

Thiết bị: Bể siêu âm Elma S100H - Đức (tần số 37kHz, cường độ sóng âm (LpZ) 103Db, công suất 150W), tủ sấy Memmert UN110Plus - Đức, cân phân tích OHAUS - Mỹ, tủ cấy LV-VC1200 - Việt Nam, tủ ẩm Memmert - Đức, tủ nuôi ASTEC SMA165DS - Hàn Quốc, nồi hấp tiệt trùng JSR JSAT-65 - Hàn Quốc.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Polysaccharit được chiết từ 10g rễ cây sâm Xuyên Đá được xử lý bằng sóng siêu âm trên thiết bị Elma S100H (Đức) có cường độ sóng âm (LpZ) 103 Db trong 0, 30, 60, 90 và 120 giây với dung môi ethanol ở nồng độ 60; 70; 80; 90 và 96% ở nhiệt độ chiết là 60°C, 70°C, 80°C và 90°C trong các khoảng thời gian 0, 30, 60, 90 và 120 giây với tỉ lệ dung môi: nguyên liệu lần lượt là 10:1; 15:1; 20:1 và 25:1 (ml/g) (Damaso & cs., 2020). Để tìm phương án tối ưu các điều kiện này, chúng tôi chọn quy hoạch bậc hai Box-Behnken (Box & cs., 1951), sử dụng tối ưu 3 yếu tố với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm lặp tại kết quả tốt nhất từng đơn yếu tố.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng polysaccharit toàn phần bằng phenol - sunfuric

Polysaccharit được định lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric axit. Các bước được mô tả tóm tắt như sau: 400µl dịch mẫu chứa polysaccharit cho tác dụng với 200µl dung dịch phenol 5%, cho thêm 1ml H₂SO₄ đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của phản ứng được phát hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 490nm. Hàm lượng polysaccharit được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose (Foster & cs., 1961).

2.3.2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn

Dịch chiết từ rễ cây sâm Xuyên Đá được loại bỏ dung môi, hoà tan bằng nước cất vô khuẩn tỉ lệ 1ml tương ứng 1g nguyên liệu (cao chiết). Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết rễ cây sâm Xuyên Đá bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn: nuôi cấy dịch huyền phù vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng lắc ở 37°C; điều chỉnh

dịch huyền phù vi khuẩn đạt độ đục chuẩn BaSO₄ 0,5 McFarland (OD 625nm); trải 100µl dịch khuẩn đã chuẩn độ đục lên đĩa petri chứa môi trường thạch LB, tiến hành đục lỗ thạch với đường kính 7mm; nạp 50µl cao chiết hòa tan trong DMSO 100 % vào lỗ thạch (nồng độ 10 mg/ml); ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó đo đường kính vòng kháng khuẩn, chứng âm DMSO 100%. Khả năng kháng khuẩn của hợp chất càng mạnh, đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ thạch càng lớn, đường kính vòng kháng khuẩn dưới 10mm là yếu, 10-15mm là vừa, 15-20mm là mạnh, trên 20mm là rất mạnh. Lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức. Các chủng khuẩn sử dụng: *Staphylococcus aureus* K, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. được hoạt hóa và trải trên môi trường LB. Dịch chiết được pha loãng trong nước cất vô khuẩn và đặt lên đĩa giấy 5mm với nồng độ 500 µg/đĩa. Kanamycin nồng độ 30 µg/đĩa làm chứng dương, nước cất 5 µl/đĩa làm chứng âm (Gislene & cs., 2000).

2.3.3. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là gốc tự do được dùng để sàng lọc tác dụng hoạt tính kháng oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu DPPH của chất thử, được xác định bằng phép đo độ hấp thụ ở bước sóng 517nm trên máy quang phổ. Pha dung dịch DPPH có nồng độ 2mM trong methanol (MeOH). Dung dịch này không bền với ánh sáng, chỉ pha trước khi dùng. Dung dịch thử: Lấy mẫu pha trong nước. Lắc đều các ống trong 15 giây, để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và đo ở bước sóng 517nm. Hoạt tính kháng oxy hóa (HTKO) được tính theo công thức (Viện Dược liệu, 2006):

$$HTKO (\%) = \frac{(OD_{\text{chứng}} - OD_{\text{thử}}) \times 100}{OD_{\text{chứng}}}$$

Trong đó: OD_{chứng}: mật độ quang học của giếng chứng không có mẫu thử; OD_{thử}: mật độ quang học của mẫu thử. Kết quả báo cáo bởi giá trị IC₅₀ là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC₅₀ càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao.

2.3.4. Đánh giá khả năng chống viêm

Khả năng kháng viêm của cao chiết sâm Xuyên Đá được khảo sát thông qua hoạt động ức chế sự biến tính protein theo phương pháp của Grant (1970) có hiệu chỉnh. Cao chiết ethanol sâm Xuyên Đá được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO) và pha loãng với dung dịch đệm phosphate (0,2M; pH = 7,4). Nồng độ cuối cùng của DMSO trong tất cả các dung dịch nhỏ hơn 2,5%. Hỗn hợp phản ứng gồm 1ml cao chiết ethanol sâm Xuyên Đá (ở các nồng độ: 0,78125; 1,5625; 3,125 và 6,25 µg/ml) được trộn với 1ml dung dịch BSA 5%. Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 27°C trong 15 phút. Sự biến tính protein được gây ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 60°C trong 10 phút. Sau khi làm mát, tiến hành đo mật độ quang tại bước sóng 660 nm. Diclofenac (một loại thuốc phổ biến chống viêm không chứa steroid) và prednisolon (một loại thuốc phổ biến chống viêm chứa corticoid) nồng độ 100, 200, 400, 800 µg/ml được sử dụng như đối chứng dương. Khả năng ức chế sự biến tính protein của cao chiết ethanol sâm Xuyên Đá được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100 (1 - Vt/Vc)$$

Trong đó: Vt: mật độ quang của mẫu thử có chứa cao chiết hoặc thuốc chuẩn, Vc: mật độ quang của mẫu chứa đệm phosphate (Grant & cs., 1970).

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu phân tích đơn yếu đồ quá trình chiết xuất được phân tích phương sai và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS (version 20). Phần mềm Design-Expert (phiên bản 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu các đơn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết

3.1.1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý bằng sóng siêu âm

Khảo sát thời gian siêu âm ở 0, 30, 60, 90 giây với 3 yếu tố còn lại cố định: tần số 37kHz, cường độ sóng âm (L_pZ) 103Db, công suất 150W. Tiến hành thí nghiệm ở các thời gian siêu âm khác nhau: 0, 30, 60, 90 giây với các thông số cố định khối lượng mẫu 10g, dung môi ethanol 80% tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu: 10/1 (ml/g), nhiệt độ chiết 70°C trong thời gian 60 phút. Dựa vào hàm lượng polysaccharit thu được (mg polysaccharit/1g nguyên liệu rễ) để lựa chọn thời gian siêu âm thích hợp, kết quả được trình bày ở bảng 1.

Qua bảng 1, cho thấy hàm lượng polysaccharit tăng khi thời gian xử lý bằng sóng siêu âm tăng. Do thời gian xử lý sóng siêu âm tăng làm tăng tác động của sóng siêu âm trong việc phá vỡ tế bào thực vật tạo điều kiện cho việc dịch chuyển các polysaccharit ra ngoài dung môi. Hàm lượng polysaccharit cao nhất ở thời gian xử lý 60 giây là 13,13 mg/g, hàm lượng polysaccharit là 11,03 mg/g ở thời gian xử lý là 30 giây, hàm lượng polysaccharit thấp hơn nhiều khi không được xử lý bằng sóng siêu âm là 7,84 mg/g. Ở thí nghiệm thời gian 60 giây và 90 giây cho hàm lượng polysaccharit khác biệt không có ý nghĩa. Lưu Hồng Sơn & cs. (2020) chiết polysaccharit, thời gian siêu âm 4 phút với vật liệu nấm lim xanh cho thấy tế bào của sâm Xuyên Đá dễ phá hơn hơn. Trong nghiên cứu này, xử lý sóng siêu âm ở thời gian 60 giây trước khi chiết được áp dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý sóng siêu âm đến hiệu quả chiết polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá

Thời gian xử lý bằng sóng siêu âm (giây)	0	30	60	90
Hàm lượng polysaccharit (mg/g rễ)	7,84 ^c	11,03 ^b	13,13 ^a	13,11 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hiệu quả chiết polysaccarit từ rễ sâm xuyên đá

Nồng độ ethanol (%)	60	70	80	90	96
Hàm lượng polysaccarit (mg/g rễ)	7,40 ^e	9,15 ^d	13,13 ^a	11,62 ^b	10,45 ^c

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu đến hiệu quả chiết polysaccarit từ rễ sâm xuyên đá

Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu	5/1	10/1	15/1	20/1
Hàm lượng polysaccarit (mg/g rễ)	9,60 ^c	13,12 ^b	14,68 ^a	14,71 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi

Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến quá trình chiết polysaccarit trong rễ sâm xuyên đá, tiến hành thí nghiệm ở nồng độ dung môi: 60, 70, 80, 90 và 96% với các thông số cố định khối lượng mẫu 10g, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu: 10/1 (ml/g), thời gian xử lý sóng siêu âm 60 giây, nhiệt độ chiết 70°C trong thời gian 60 phút (Damaso & cs., 2020). Dựa vào hàm lượng polysaccarit để lựa chọn nồng độ dung môi thích hợp, kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2.

Qua bảng 2 cho thấy chiết ở nồng độ ethanol khác nhau sẽ được hàm lượng polysaccarit khác nhau, hàm lượng tăng nồng độ ethanol từ 60%-80%. Polysaccarit cao nhất (13,13 mg/g) tại nồng độ 80%, tiếp tục tăng nồng độ ethanol thì hàm lượng polysaccarit giảm. Nồng độ dung môi thích hợp để tách chiết phụ thuộc vào các phần, loài thực vật (Chew & cs., 2011). Lưu Hồng Sơn & cs. (2020) chiết polysaccarit tổng từ nấm lim xanh sử dụng ethanol 80%. Võ Hoài Bắc & cs. (2018). sử dụng ethanol 25% với nguyên liệu là cây xuân hoa. Trong nghiên cứu này, ethanol nồng độ 80% được lựa chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Ảnh hưởng tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu

Lượng dung môi nhiều hay ít đều ảnh hưởng đến quá trình chiết các chất trong

nguyên liệu. Nếu lượng dung môi quá ít thì chỉ đủ để thấm ướt nguyên liệu, vì vậy hiệu suất chiết sẽ thấp. Ngược lại, nếu lượng dung môi sử dụng quá nhiều thì gây hao phí dung môi, nhiên liệu trong quá trình lọc cô và các chi phí khác. Tiến hành thí nghiệm với các tỉ lệ dung môi/nguyên liệu chiết lần lượt là: 5/1, 10/1, 15/1 và 20/1 với nồng độ ethanol 80%, thời gian xử lý siêu âm 60 giây, nhiệt độ chiết 70°C trong thời gian chiết 60 phút. Kết quả trình bày ở bảng 3.

Qua bảng 3, ta thấy hàm lượng polysaccarit tăng khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng. Tuy nhiên khi tăng dần tỉ lệ dung môi sử dụng từ 15/1 tới 20/1 thì hàm lượng polysaccarit tăng không đáng kể và không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $P = 0,05$. Điều này có thể giải thích tại tỉ lệ 15/1 đã cân bằng nồng độ giữa trong vật chất chiết và dung môi. Võ Hoài Bắc đã nghiên cứu tách chiết polysaccarit với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 10/1, nghiên cứu cũng chỉ ra sự khác nhau ở đây do vật liệu và quy trình tách chiết khác nhau (Võ Hoài Bắc, 2018). Vậy để đảm bảo hiệu suất chiết cũng như để giảm thiểu chi phí sản xuất, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 15/1 được lựa chọn làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Thời gian chiết ảnh hưởng đến hiệu quả chiết và chi phí năng lượng cũng như dung môi. Nếu thời gian chiết ngắn, các hoạt chất giải phóng ra ít, nhưng khi tăng thời gian chiết thì làm tổn hao năng lượng, quá trình sản xuất kéo dài. Khảo sát các mức thời gian 30, 60, 90 và

120 phút, ở nồng độ ethanol 80%, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu: 15/1 (ml/g), thời gian siêu âm 60 giây, nhiệt độ chiết 70°C và kết quả được ghi ở bảng 4.

Qua bảng 4, nhận thấy: Thời gian chiết tăng, hàm lượng polysaccharit tăng. Tuy nhiên, đến một thời gian chiết nhất định thì lượng hoạt chất tăng lên rất chậm hoặc có xu hướng giảm xuống. Khi chiết ở thời gian 30 phút thì hàm lượng polysaccharit thu được thấp (12,42 mg/g). Hoạt chất tăng nhanh khi chiết ở 60 phút, với hàm lượng polysaccharit là 14,68 mg/g. Sau 90 phút chiết, lượng polysaccharit thu được cao nhất 15,22 mg/g. Tuy nhiên, sau 90 phút, hàm lượng polysaccharit có xu hướng giảm, điều này có thể giải thích rằng tại thời điểm 90 phút là thời điểm hoà tan polysaccharit bão hoà nhiều nhất. Tiếp tục tăng thời gian chiết có thể khiến polysaccharit bị phân huỷ một phần. Nghiên cứu của Damaso & cs. (2020) cho thấy thời gian chiết là 120 phút đối với thân sâm xuyên đá, kết quả chỉ ra thời gian chiết polysaccharit từ rễ chiết nhanh hơn từ thân. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn thời gian chiết ở 90 phút để chiết polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá.

3.1.5. Ảnh hưởng nhiệt độ chiết

Nhiệt độ là một trong các yếu tố ảnh hưởng rất lớn tới quá trình chiết. Khi nhiệt độ chiết càng cao sẽ làm cho độ xốp của nguyên liệu tăng lên (do nguyên liệu trương nở), giảm độ nhớt và hoạt chất sẽ hòa tan dễ hơn vào dung môi. Tuy nhiên, nhiệt độ là một yếu tố có giới hạn vì nhiệt độ quá cao có thể xảy ra các phản ứng không cần thiết như tăng độ tan của một số tạp chất,

khó khăn cho quá trình lọc, thúc đẩy các biến đổi hóa học làm chất lượng dịch chiết biến đổi không có lợi và làm tăng chi phí sản xuất. Do đó nghiên cứu tiến hành các thí nghiệm khảo sát ở nhiệt độ 60°C, 70°C, 80°C và 90°C ở nồng độ ethanol 80%, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu 15/1 (ml/g), xử lý sóng siêu âm trong 60 giây, thời gian chiết 90 phút. Kết quả thu được trình bày qua bảng 5.

Theo bảng 5, khi nhiệt độ tăng thì hàm lượng polysaccharit tăng lên tỉ lệ với độ cao của nhiệt độ. Ở nhiệt độ 60°C cho hàm lượng polysaccharit là 14,12 mg/g, sau đó khi tăng lên 70°C cho hàm lượng polysaccharit là 15,24 mg/g và hàm lượng polysaccharit đạt được cao nhất khi chiết ở nhiệt độ 80°C với hàm lượng đạt 16,06 mg/g. Điều này có thể được giải thích là do trong quá trình chiết bằng dung môi ethanol, khi ta tăng dần nhiệt độ làm cho động học của quá trình chiết cũng tăng lên và các chất được chiết ra khỏi tế bào thực vật tốt hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ càng tăng, một số chất có thể bị phân huỷ, ngoài ra khi nhiệt độ chiết cao hơn nhiệt độ sôi của ethanol sẽ gây trở ngại cho quá trình chiết, do vậy làm giảm khả năng chiết tách. Nghiên cứu của Damaso & cs. (2020) đã xác định nhiệt độ chiết trên đối tượng thân sâm Xuyên Đá là 90°C. Theo nghiên cứu của Nguyễn Văn Bình & cs. (2018), nhiệt độ chiết polysaccharit trong nấm linh chi đỏ là 90°C. Sự khác nhau ở đây do khác nhau vật liệu, quy trình và dung môi sử dụng. Vì vậy nhiệt độ 80°C được chọn là nhiệt độ thích hợp cho chiết các hoạt chất trong sâm xuyên đá.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả chiết polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá

Thời gian (phút)	30	60	90	120
Hàm lượng polysaccharit (mg/g rễ)	12,42 ^c	14,68 ^b	15,22 ^a	15,18 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả chiết polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá

Nhiệt độ (°C)	60	70	80	90
Hàm lượng polysaccharit (mg/g rễ)	14,12 ^c	15,24 ^b	16,06 ^a	16,02 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có chỉ số mũ khác nhau thì có sự khác nhau ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

3.2. Tối ưu hóa quá trình tách chiết polysaccarit từ rễ sâm Xuyên Đá theo phương pháp quy hoạch bậc hai

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện tách chiết, những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách bao gồm nồng độ dung môi, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian siêu âm. Phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ được sử dụng cho nghiên cứu. Các số liệu được xử lý trên phần mềm Design-Expert 7 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh các thông số thống kê.

Thí nghiệm tối ưu hóa quá trình chiết suất polysaccarit từ rễ sâm Xuyên Đá được thiết kế thử nghiệm bằng mô hình Box-Behnken với 17 đơn vị thí nghiệm và 3 lần lặp lại với các biến được lựa chọn. Các nhân tố được tối ưu bao gồm nồng độ ethanol (X1) ở mức (-1, 0, +1) tương ứng (70%, 80%, 90%); tỉ lệ dung môi/nguyên liệu

(X2) ở mức (-1, 0, +1) là (10 ml/g, 15 ml/g, 20 ml/g) và thời gian siêu âm (X3) ở mức (-1, 0, +1) là (30 giây, 60 giây, 90 giây).

Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng polysaccarit tổng số:

$$Y = + 16,06 + 0,62*A + 0,23*B + 0,48*C + 0,43*A*B + 0,07*A*C + 0,7*B*C - 2,1*A^2 - 1,77*B^2 - 0,24*C^2$$

Trong đó: Y là hàm lượng polysaccarit tổng số trong dịch chiết thu được; các giá trị A, B, C lần lượt là các giá trị của các yếu tố nồng độ dung môi, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian siêu âm.

Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình, từ đó cho biết tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polysaccarit. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng 7.

Bảng 6. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố và hàm lượng polysaccarit tổng số từ rễ sâm Xuyên Đá trong các điều kiện tách chiết khác nhau

TN	Biến thực			Hàm lượng polysaccarit tổng số (mg/g nguyên liệu rễ)
	A - ethanol	B-DM/NL	C-TG siêu âm	
1	70	10	60	11,79
2	90	10	60	11,96
3	70	20	60	11,55
4	90	20	60	13,44
5	70	15	30	12,64
6	90	15	30	13,93
7	70	15	90	13,36
8	90	15	90	14,93
9	80	10	30	14,06
10	80	20	30	12,96
11	80	10	90	13,72
12	80	20	90	14,93
13	80	15	60	16,07
14	80	15	60	16,06
15	80	15	60	16,07
16	80	15	60	16,05
17	80	15	60	16,05

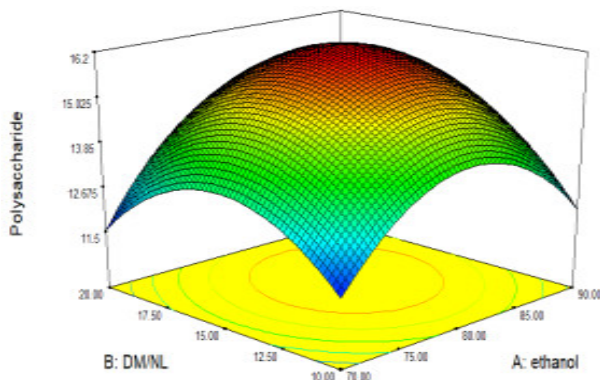
Ghi chú: A: Nồng độ dung môi ethanol (%); B: Tỉ lệ giữa thể tích dung môi/nguyên liệu (ml/g); C: Thời gian siêu âm (giây).

Tối ưu hóa các thông số tách chiết polysaccharit và đánh giá hoạt tính sinh học từ rễ cây sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume)

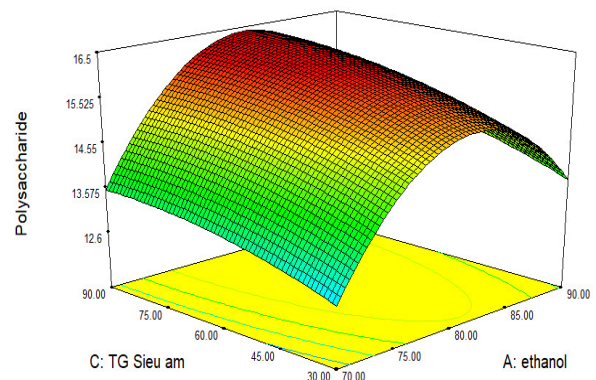
Bảng 7. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình tách chiết dịch từ rễ sâm xuyên đá

Nguồn	Chuẩn F	Giá trị P
Model	218,95	<0,0001
Lack of Fit	502,08	0,09
R ²	0,9642	

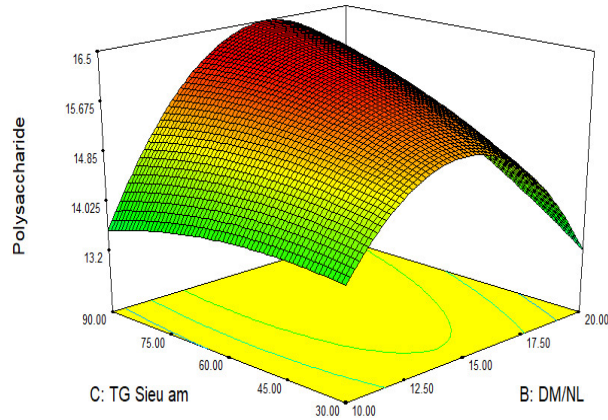
Chú thích: Chuẩn F: Chuẩn Fisher; "Lack of Fit": Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm. R²: Hệ số hồi quy



(a)



(b)



(c)

Ghi chú: (a): Mô hình tương tác giữa nồng độ ethanol và tỉ lệ DM/NL (thời gian siêu âm được giữ ở mức trung bình); (b): Mô hình tương tác giữa nồng độ ethanol và thời gian siêu âm (tỉ lệ DM/NL giữ ở mức trung bình), (c): Mô hình tương tác thời gian siêu âm và tỉ lệ DM/NL (nồng độ ethanol giữ ở mức trung bình).

Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng polysaccharit

Kiểm tra sự có ý nghĩa và sự tương thích của mô hình được tiến hành bằng phân tích bảng 8, phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value < 0,0001 < 0,05 do đó

mô hình được lựa chọn có ý nghĩa. Hệ số hồi quy R² = 0,9642. Kết quả này cho thấy có 96,42% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình.

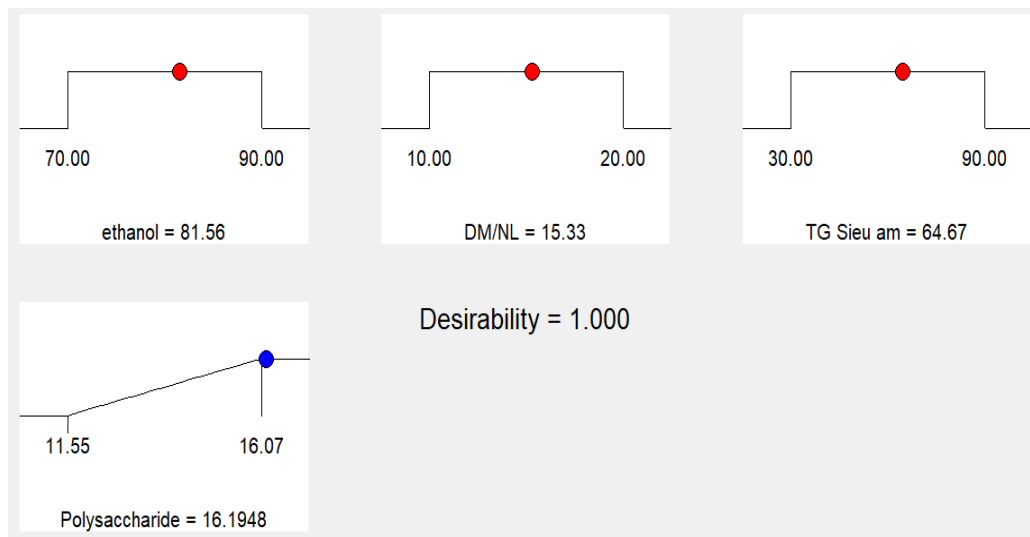
Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu hàm lượng polysaccharit thu được từ dịch chiết rễ sâm Xuyên Đá bằng phần mềm Design-Expert (DX 7.1.5). Trong đó, phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu là: ethanol 81,56%, tỉ lệ dung môi chiết/nguyên liệu 15,33 ml/g rễ, thời gian siêu âm 64,67 giây. Khi đó hàm lượng polysaccharit đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là 16,1948 mg/g rễ (hình 2) kết quả này có độ tương thích cao so với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm. Kết quả được trình bày ở hình 2.

3.3. Đánh giá hoạt tính sinh học

3.3.1. Khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết

polysaccharit tổng số từ rễ sâm Xuyên Đá được thể hiện ở bảng 8. Kết quả cho thấy cao chiết từ rễ sâm Xuyên Đá có khả năng ức chế sinh trưởng các chủng vi khuẩn gây bệnh nhưng không mạnh (đường kính vòng kháng khuẩn <10mm). Từ bảng 8 ta thấy khả năng kháng khuẩn từ cao chiết polysaccharit tổng số từ rễ sâm Xuyên Đá không cao, với 04 chủng vi sinh vật kiểm định là *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* K có đường kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn 10mm. Đối với 03 chủng kiểm định là *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* có đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn 10mm nhưng cũng không lớn hơn 20mm.



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng polysaccharit

Bảng 8. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết polysaccharit tổng số từ rễ sâm Xuyên Đá (mm)

Chủng vi khuẩn khảo sát	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> K	8,01 ± 0,38
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,06 ± 0,81
<i>Shigella flexneri</i>	8,03 ± 0,41
<i>Bacillus subtilis</i>	6,84 ± 0,47
<i>Escherichia coli</i>	15,33 ± 0,76
<i>Pseudomonas</i> spp.	9,39 ± 0,38
<i>Salmonella</i> spp.	10,13 ± 0,47

Tối ưu hóa các thông số tách chiết polysaccharit và đánh giá hoạt tính sinh học từ rễ cây sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* (Wall.) Blume)

Bảng 9. Hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết polysaccharit tổng số của rễ sâm xuyên đá

Mẫu	Dịch chiết tổng từ rễ Sâm Xuyên Đá
IC ₅₀ (µg/ml)	168,94 ± 05,28

Bảng 10. Kết quả đánh giá khả năng chống viêm của polysaccharit tổng số trong rễ sâm xuyên đá

Nồng độ cao chiết (µg/ml)	Hiệu suất ức chế sự biến tính BSA (%)			Nồng độ diclofenac, prednisolon (µg/ml)
	Cao chiết từ rễ	Diclofenac	Prednisolon	
0,78125	28,31 ^d ± 1,04	48,11 ^d ± 0,54	49,61 ^d ± 0,54	100
1,5625	33,76 ^c ± 1,06	58,69 ^c ± 0,63	60,29 ^c ± 0,64	200
3,125	50,04 ^b ± 2,03	68,11 ^b ± 0,61	69,74 ^b ± 0,47	400
6,350	71,14 ^a ± 2,81	84,53 ^a ± 0,91	91,04 ^a ± 1,53	800

Ghi chú: Các giá trị có các chữ cái theo sau khác nhau trong cùng một hàng thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa $P = 0,05$.

3.3.2. Đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết polysaccharit tổng số

Hoạt tính kháng oxy hoá của dịch chiết polysaccharit tổng số của rễ sâm Xuyên Đá thể hiện ở bảng 9.

Chất có hoạt tính kháng oxy hóa sẽ nhường điện tử cho gốc tự do DPPH để 5tạo thành phân tử DPPH bền và mất đi màu tím đặc trưng ban đầu. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH của cao ethanol và giá trị IC₅₀. Nghiên cứu của Praveen & cs. (2014) cho thấy dịch chiết rễ sâm Xuyên Đá từ Ấn Độ cho IC₅₀ là 37,5 µg/ml. Điều này có thể được giải thích bởi rễ sâm Xuyên Đá giữa các nghiên cứu có số tuổi khác nhau.

3.3.3. Đánh giá khả năng chống viêm

Kết quả đánh giá khả năng chống viêm của polysaccharit tổng số trong rễ sâm Xuyên Đá được thể hiện ở bảng 10.

Phân tích kết quả thu được trong dãy nồng độ khảo sát cho thấy, prednisolone (thuốc kháng viêm corticoid) và diclofenac (NSAIDs) là hai chất thể hiện khả năng ức chế biến tính protein cao nhất xét ở nồng độ 800 µg/ml tương ứng là 91,04% và 84,53%. Kết quả cho thấy khả năng ức chế sự biến tính BSA của polysaccharit chiết từ rễ sâm Xuyên Đá yếu hơn và

prednisolon được sử dụng như đối chứng dương. Khả năng ức chế sự biến tính BSA của polysaccharit tổng số trong rễ sâm Xuyên Đá tỉ lệ thuận với nồng độ, tăng từ 28,31% ở nồng độ 0,78125 µg/ml lên 71,14% ở nồng độ 6,35 µg/ml

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này thời gian xử lý sóng siêu âm, nồng độ dung môi, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian, nhiệt độ chiết ảnh hưởng tới quá trình tách chiết polysaccharit từ rễ sâm Xuyên Đá cho kết quả tương ứng: 60 giây, ethanol 80% (v/v), 15/1 (ml/g), 90 phút và 80°C. Đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết polysaccharit từ rễ sâm xuyên đá: nồng độ ethanol 81,56%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 15,33/1 (ml/g), thời gian siêu âm là 64,67, thời gian chiết 90 phút. Trong điều kiện này hàm lượng polysaccharit tổng số chiết đạt 16,1948 mg/g nguyên liệu rễ cây sâm xuyên đá. Dịch chiết sau tối ưu từ rễ sâm Xuyên Đá có khả năng ức chế sinh trưởng các chủng vi khuẩn gây bệnh nhưng không mạnh, có giá trị IC₅₀ = 168,94 ± 5,28 (µg/ml) khi đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa, kháng viêm của dịch chiết thấp hơn diclofenac, prednisolon khá nhiều. Kết quả này sẽ tạo cơ sở cho việc chiết hoạt chất khác cho các nghiên cứu sau này.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu là sản phẩm của dự án tỉnh Thái Nguyên “Xây dựng mô hình tạo sản phẩm hỗ trợ sức khỏe từ sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium*) trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên”, mã số DACN.09/2019 thời gian thực hiện từ 2019-2021, nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sở KH&CN tỉnh Thái Nguyên đã tạo điều kiện hỗ trợ kinh phí để nhóm tác giả thực hiện thành công nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Box G.E.P. & Wilson K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 13(1): 1-45.
- Bùi Hồng Quang & Vũ Tiến Chính (2011). Những loài cây được sử dụng làm thuốc trong họ Nhài ở Việt Nam. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4, tr. 1260.
- Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M. Z., Wan Aida W.M. & Ho C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*. 18(4): 1427-1435.
- Damaso Pauline, Igbonekwu-udoji Reagan Jonas, Lê Thị Thu Hiền, Lê Thu Thủy, Cao Hồng Lê, Lưu Hồng Sơn, Vi Đại Lâm, Nguyễn Thị Tinh, Tạ Thị Lượng & Đinh Thị Kim Hoa (2020). Nghiên cứu quy trình tách chiết polysaccharide tổng từ thân cây sâm Xuyên Đá (*Myxopyrum smilacifolium* wall. blume) và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa. *Tạp chí Khoa học - Đại học Tân trào*. 17: 36-41.
- Foster D.S. & Cornella T.S. (1961). *Colorimetric Method of Analysis*. Nostrand Company Inc New Jersey. 8: 162.
- Grant N.H., Alburn H.E. & Kryzanasuskas C. (1970). Stabilization of serum albumin by antiinflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*. 19(3): 715-722.
- Gislene G.F. Nascimento, Juliana Locatelli, Paulo C. Freitas & Giuliana L. Silva (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibioticresistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 247-256.
- Lưu Hồng Sơn, Tạ Thị Lượng, Vi Đại Lâm, Nguyễn Thị Tinh, Đinh Thị Kim Hoa, Trịnh Thị Chung & Huỳnh Thị Thiệp (2020). Nghiên cứu quá trình trích ly polysaccharides từ nấm lim xanh (*Ganoderma lucidium*). *Tạp chí khoa học - Đại học Tân trào*. 17: 20-26.
- Nguyễn Văn Bình, Phạm Thị Phương & Nguyễn Tá Lợi (2018). Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly hàm lượng polysaccharide toàn phần trong nấm linh chi đỏ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*. 180(4): 3-8.
- Nguyễn Văn Đàn & Nguyễn Việt Tựu (1985). *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*. Nhà xuất bản Y học.
- Phạm Bảo Trương & Nguyễn Minh Thủy. Tối ưu hóa quá trình trích ly polysaccharide và tannin trong nấm linh chi đỏ (*Ganoderma lucidium*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ (Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học)*: 36: 21-28.
- Praveen R.P. & Ashalatha S.N. (2014). Callus induction and multiplication of internodal explants of *Myxopyrum smilacifolium* Blume. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(10): 612-617.
- Trần Hữu Danh, Lương Vinh Quốc Danh, Trần Thanh Quang, Nguyễn thị Trâm, Huỳnh Minh Trí & Trần Hữu Nghi (2017). Bề rửa ứng dụng sóng siêu âm. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ (Phần A)*. 52: 46-53.
- Viện Dược liệu (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ Dược thảo*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- Võ Hoài Bắc (2018). Nghiên cứu tách chiết và tác dụng tăng cường miễn dịch của các polysaccharide từ lá cây thuốc xuân hoa *pseudanthemum palatiferum* (nees) radlk. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 16(2): 327-335.