

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất Saponin từ sâm Lai Châu (*Panax Vietnamensis* var. *Fuscidicus*)

Phạm Trung Thành*, Nguyễn Như Ngọc, Vũ Kim Dung

Trường Đại học Lâm nghiệp

Optimization of saponin extraction from *Panax Vietnamensis* var. *Fuscidicus*

Pham Trung Thanh*, Nguyen Nhu Ngoc, Vu Kim Dung

Vietnam National University of Forestry

*Corresponding author: thanhpt@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.1.2025.015-024>

TÓM TẮT

Saponin là hợp chất có vai trò vô cùng quan trọng đối với sức khỏe con người. Vì vậy, chúng được sử dụng để đánh giá chất lượng nhân sâm. Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất để xác định hàm lượng saponin tổng số từ sâm Lai Châu đã được thực hiện. Các mẫu bột sâm Lai Châu chiết bằng dung môi kết hợp siêu âm, định lượng bằng phương pháp UV-VIS. Tối ưu hóa điều kiện tách chiết saponin tổng số theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken bằng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm của 3 yếu tố khảo sát: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (5/1-30/1 mL/g), nồng độ ethanol (50-85%), thời gian siêu âm (10-60 phút). Điều kiện tối ưu mẫu bột là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 20/1 (mL/g), nồng độ ethanol 75% và thời gian siêu âm 47 phút; hàm lượng saponin tổng số thu được so với mẫu bột khô đạt 21,08 g/100 g. Hàm lượng saponin phân tích bằng HPLC với sâm Lai Châu đạt ginsenosid Rg1 6,3 g/100 g, Rb1 2,8 g/100 g và MR2 8,4 g/100 g. Kết quả của nghiên cứu đã cung cấp một phương pháp chiết xuất hiệu quả để đánh giá chất lượng sâm Lai Châu hoặc chiết xuất saponin từ sâm Lai Châu.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/08/2024

Ngày phản biện: 25/09/2024

Ngày quyết định đăng: 28/10/2024

Từ khóa:

Chiết xuất, saponin tổng số, sâm Lai Châu, siêu âm, tối ưu.

ABSTRACT

Saponins are compounds that play an extremely important role in human health. Therefore, they are used to evaluate the quality of ginseng. The study on optimizing extraction conditions to determine the total saponin content from Lai Chau ginseng is conducted. Samples are extracted using solvents combined with Ultrasound-assisted, quantified using the UV-VIS method. Optimizing the extraction conditions for total saponins using the response surface method and Box-Benken planning using Design-Expert software. The experimental matrix consisted of 17 experiments of 3 investigated factors: solvent/raw material ratio (5/1-30/1 mL/g), ethanol concentration (50-85%), ultrasound time (10-60 minutes). The optimal conditions for powder samples are solvent/raw material ratio of 20/1 (mL/g), ethanol concentration of 75% and ultrasound time of 47 minutes; The total saponin content obtained was 21.08 g/100 g. The content analyzed by HPLC with Lai Chau ginseng reached ginsenoside Rg1 of 6.3 g/100 g, Rb1 of 2.8 g/100 g and MR2 8.4 g/100 g. The results of the study provided an effective extraction method to determine the saponin content in Lai Chau ginseng or extract saponin from Lai Chau ginseng.

Keywords:

Extraction, Lai Chau ginseng, optimization, supersonic, total saponin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân sâm là loại dược liệu quý và đang được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam và trên thế giới. Nhân sâm (*Ginseng*) thuộc họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*), cho đến nay các nhà khoa học đã cập nhật 17 loài sâm trên thế giới. Thành phần

chủ yếu trong rễ sâm là saponin triterpen. Saponin có vai trò quan trọng là thành phần quyết định tác dụng của nhân sâm, cũng là chất có khả năng tạo ra những ảnh hưởng tích cực đối với sức khỏe.

Sâm Lai Châu (sâm LC) – là một loại sâm đặc

hữu mà Việt Nam hiện đang là quốc gia duy nhất trên thế giới sở hữu, có nhiều hoạt chất và tác dụng quý như sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*). Đây là một vị thuốc quý mà các tác dụng dược lý như: tăng lực, tăng trí nhớ, bảo vệ cơ thể chống stress, bảo vệ và tác động lên hệ miễn dịch giúp chống viêm, bảo vệ tế bào chống lão hóa, tăng sức đề kháng cho cơ thể và điều trị bệnh tim mạch... đã được nhiều nhà khoa học ngoài nước nghiên cứu (Wang J. và cộng sự, 2013; Mahady G.B. và cộng sự, 2000; Choi, H.I. và cộng sự, 2011; Fernandez-Moriano và cộng sự, 2017; Lee, Y.Y. và cộng sự, 2021) [1-5]. Đáng chú ý nhất là hoạt chất Majonoside R2 - MR2, một hoạt chất mới đặc trưng, tạo ra giá trị lớn của các loài sâm Việt Nam cũng có trong sâm LC.

Theo kết quả phân tích công bố (Đỗ Thị Hà, 2016) [6] củ sâm LC có thành phần saponin phong phú với 52 loại hoạt chất quý hiếm tương tự như sâm Ngọc Linh. Nhóm tác giả Trần Thị Kim Hương và cộng sự, 2019) [7] đã tiến hành định lượng saponin bằng phương pháp cân cho thấy hàm lượng saponin tổng số trong các mẫu sâm LC đạt khoảng 20%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hàm lượng saponin tổng số của sâm LC tăng dần khi tăng số tuổi, đồng thời mẫu thu được ở tự nhiên có hàm lượng saponin tổng số (trung bình khoảng 23%) cao hơn mẫu trồng (trung bình khoảng 18,47%).

Hiện nay có nhiều phương pháp đã được sử dụng để tách chiết saponin từ các loài *Panax* (*P. notoginseng*, *P. quinquefolius*, *P. ginseng*...) ở cả dạng nguyên gốc (củ, lá, hoa) lẫn các chế phẩm chứa nhân sâm như phương pháp chiết xuất Soxhlet, chiết xuất hồi lưu nhiệt, chiết xuất siêu âm, chiết pha rắn, chiết xuất có hỗ trợ vi sóng, chiết xuất có hỗ trợ enzyme... Quy trình chiết saponin từ mẫu bột nguyên liệu khô bằng methanol cũng đã được nghiên cứu bởi các tác giả như Wan và cộng sự, 2012; Yang và cộng sự, 2021; Wan J.B. và cộng sự, 2005 [5, 8, 9].

Phạm Thị Mỹ Tiên và cộng sự (2021) [10] đã nghiên cứu điều kiện tách chiết saponin tổng số từ sâm Bồ Chính bằng phương pháp siêu âm. Quá trình tối ưu hóa điều kiện bằng phương pháp bề mặt đáp ứng được thực hiện trên phần

mềm Mode 5.0 (Sartorius Stedim Biotech Company) với thời gian siêu âm 11,4 phút, công suất siêu âm 57,2 W/g, cho hàm lượng saponin tổng đạt giá trị cực đại $2,577 \pm 0,056$ g/100 g. Đối với dược liệu Đảng Sâm, Trương Hoàng Duy và cộng sự (2015) [11] đã thực hiện tối ưu hoá điều kiện chiết xuất saponin kết hợp với enzyme alpha-amylase. Hàm lượng saponin tổng thu được 1557,23 mg/100 g cao hơn 1,5 lần khi không sử dụng enzyme ở cùng điều kiện. Đồng thời JianYong Wu và cộng sự (2001) [12] thực hiện việc chiết xuất saponin với nhiều phương pháp khác nhau như: ngâm, kết hợp siêu âm, chiết xuất Soxhlet trên mẫu sâm Mỹ và sâm Trung Quốc. Thí nghiệm cho thấy hiệu quả chiết xuất kết hợp siêu âm cho hàm lượng saponin cao hơn gấp 3 lần so với phương pháp chiết xuất thông thường, có thể thực hiện được ở nhiệt độ thấp tránh việc phân huỷ các hoạt chất chịu nhiệt kém và dễ dàng tinh sạch cũng như loại bỏ các hoạt chất mong muốn.

Việc nghiên cứu các hợp chất saponin trong sâm Lai Châu và tối ưu hóa các điều kiện tách chiết trước đây chưa được thực hiện cụ thể. Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất saponin từ sâm LC với các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết như: phương pháp chiết, thời gian, nhiệt độ, loại dung môi, nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu... Đồng thời đây là tiền đề để xây dựng quy trình tách chiết và định lượng saponin tổng số từ sâm LC cũng như các loại nhân sâm nói chung.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bột được nghiền từ củ sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidicus*) 5 năm tuổi (thu thập ở rừng Lai Châu vào tháng 6/2023) sấy khô tới độ ẩm 10% đã kiểm nghiệm theo các chỉ tiêu cảm quan, vi phẫu, soi bột, định tính theo Dược điển Việt Nam V.

Chất chuẩn Rb1, Rg1, MR2 được cung cấp bởi Viện Dược liệu; hóa chất methanol (MeOH), ethanol (C₂H₅OH), acetonitrile (CH₃CN), ethyl acetat (EtOAc), chloroform (CHCl₃), acid acetic (CH₃COOH), n-butanol (n-BuOH) (Merk), diethyl ether, nước cất 2 lần.

Hệ thống thiết bị HPLC (Shimadzu LC –

2030C 3D Plus), cột: Shimpack GIST C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); thiết bị siêu âm Bandelin Sonopuls (Đức), máy quang phổ UV-Vis, cô chân không, ly tâm, voltex... tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh – Hóa sinh, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định và lựa chọn phương pháp chiết xuất saponin tổng số

Quá trình tách chiết saponin từ mẫu bột sâm kích thước 1 – 2 mm được thực hiện theo phương pháp Phạm Thị Mỹ Tiên và cộng sự (2021), Trinh Thi Thu Thuy và cộng sự (2007) [10, 13].

Với mỗi mẫu tiến hành đồng thời bốn phương pháp chiết là đun hồi lưu, ngâm lạnh, chiết nóng và chiết siêu âm nhằm khảo sát phương pháp đạt được hiệu suất chiết cao. 100g bột sâm được bổ sung dung môi ethanol 70% (sử dụng nước cất cho phương pháp chiết nóng) với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 10/1 (mL/g). Tiếp đó đun hồi lưu hỗn hợp với nhiệt độ 70°C trong 3 giờ (phương pháp đun hồi lưu) hoặc khuấy từ trong 24 giờ (phương pháp ngâm lạnh) hoặc chiết xuất trong bình cô quay trên nồi cách thủy ở nhiệt độ 50°C trong 2 giờ (phương pháp chiết nóng) hoặc siêu âm trong 1 giờ ở 50°C với công suất 25% (phương pháp chiết siêu âm). Sau đó, rút dịch chiết lần 1, lọc

thu dịch và tiếp tục chiết bã dược liệu với ethanol 70% hoặc nước cất với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 5/1 (mL/g) tương tự như trên (2 lần).

Tất cả các dịch chiết được lọc, gộp sau ba lần chiết xuất, lọc qua giấy lọc sau đó cô quay chân không ở 50°C để thu được cao tổng saponin. Tiếp theo, lấy 0,5 gam cao tổng hòa tan trong 20 mL nước cất thu dịch nước. Dịch nước được loại tạp với diethyl ether đến khi lớp diethyl ether hết màu hoặc màu rất nhạt, gạn bỏ dịch diethyl ether (diethyl ether được thu hồi). Dịch nước tiếp tục được chiết với n-butanol bão hòa nước đến khi kiệt saponin. Toàn bộ dịch n-butanol thu được sau khi rửa với nước cất 3 lần, cô chân không thu hồi n-butanol và thu được cao n-butanol. Các mẫu thu được sẽ được pha loãng tới nồng độ phù hợp, định lượng hàm lượng saponin tổng số bằng phương pháp đo quang (UV-Vis).

2.2.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến chiết xuất saponin tổng số

Cân 5,0 g bột sâm LC, cho nguyên liệu vào bình chiết trung gian đặt trong bể ổn nhiệt thêm dung môi và chiết xuất bằng phương pháp siêu âm theo các điều kiện xác định cho từng thí nghiệm theo bảng 1. Sau khi chiết xuất, thu lấy dịch chiết, lọc và định lượng saponin bằng phương pháp UV-Vis.

Bảng 1. Các yếu tố ảnh hưởng đến chiết xuất saponin tổng số

Thí nghiệm nghiên cứu	Số lần chiết (lần)	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Dung môi	Kích thước nguyên liệu (mm)
Ảnh hưởng của loại dung môi	2	10/1	50	60	Nước, Ethanol (30, 50, 70, 90%)	1-2
Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu	2	10/1	50	60	Ethanol 70%	0,5 – 1; 2 – 5; 6 – 10
Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	2	40/1, 30/1, 20/1, 10/1	50	60	Ethanol 70%	0,5 – 1
Ảnh hưởng của nhiệt độ	2	20/1	40, 50, 60	60	Ethanol 70%	0,5 – 1
Ảnh hưởng của thời gian siêu âm	2	20/1	50	10, 30, 50, 70, 90	Ethanol 70%	0,5 – 1
Ảnh hưởng của số lần chiết	1, 2, 3, 4	20/1	50	50	Ethanol 70%	0,5 – 1

2.2.3. Tối ưu hóa các điều kiện tách chiết saponin tổng số

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết saponin tổng số theo phương pháp bề mặt đáp ứng và quy hoạch Box-Benken, sử dụng phần mềm Design-Expert. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng chạy của 3 yếu tố khảo sát là: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (5/1-30/1 mL/g), nồng độ ethanol (50-85°), thời gian siêu âm (10-60 phút). Quá trình chiết xuất được chia làm 2 lần, siêu âm ở nhiệt độ 50°C (ổn định nhiệt độ bằng bể ổn nhiệt), dịch chiết được gộp lại, ly tâm và lọc dịch qua màng 0,45 µm, tiếp đó dịch chiết được phân tích hàm lượng saponin.

2.2.4. Xác định hàm lượng saponin tổng số

Hàm lượng saponin tổng số trong cao chiết saponin tổng số được xác định bằng phương pháp đo quang (UV-Vis) với chất chuẩn diosgenin và thuốc thử vanillin (Liu và cộng sự, 2016; Đỗ Thị Hà và cộng sự, 2018; Nguyễn Văn Bản và cộng sự, 2018; Hoàng Thị Thùy Trang và cộng sự, 2020) [6, 14-16]. Hàm lượng saponin tổng số (mg) chiết được trên 1 g nguyên liệu tính theo công thức sau:

$$\text{Saponin (mg/g)} = \frac{C \times n \times V \times 100}{M \times (100 - h)}$$

Trong đó:

C: Nồng độ saponin tổng số trong dịch chiết tính theo diosgenin (mg/mL);

V: Thể tích dịch chiết (mL);

M: Khối lượng dược liệu (g);

n: Hệ số pha loãng;

h: Độ ẩm dược liệu (%).

2.2.5. Định lượng saponin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

Phương pháp HPLC được thực hiện với thiết bị HPLC Shimadzu LC – 2030C 3D Plus duy trì ở nhiệt độ 30 °C và cột Shimpack GIST C18 (250x4,6 mm, 5 µm) theo phương pháp của Trần Bảo Trâm và cộng sự, 2017; Bùi Thế Vinh và Võ Sỹ Nhật, 2023; Dam Thi Thu và cộng sự, 2021 [17-19]. Pha động là hỗn hợp : pha A (nước), pha B (acetonitrile 100%). Tốc độ dòng 1 mL/phút và thể tích tiêm 10 µL. Thời gian phân tích 90 phút với gradient : 0 phút, 20%B; 45 phút, 20%B; 49 phút, 40%B; 54 phút, 80%B; 59 phút, 80%B. Bước sóng phát hiện ở 203 nm.

2.2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp, số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel và Design-Expert version 11 (State-Ease, Inc., Minneapolis, Mỹ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lựa chọn phương pháp chiết xuất saponin

Chiết xuất saponin tổng số từ củ sâm LC theo các phương pháp đun hồi lưu, ngâm lạnh, chiết nóng và siêu âm. Định lượng các mẫu thu được kết quả như Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chiết xuất saponin của các phương pháp chiết

TT	Phương pháp	Tỷ lệ saponin tổng số chiết xuất so với dược liệu (%)
1	Đun hồi lưu	13,26 ± 0,22
2	Ngâm lạnh	12,85 ± 0,33
3	Chiết nóng	13,78 ± 0,30
4	Chiết siêu âm	14,05 ± 0,42

Kết quả Bảng 2 cho thấy phương pháp chiết siêu âm cho hàm lượng saponin tổng số cao nhất (14,05%) và thấp nhất là phương pháp ngâm lạnh (12,85%). Saponin là chất có độ phân cực cao khi kết hợp với sóng siêu âm tác động lên các phân tử phân cực như nước và ethanol làm cho chúng quay cực nên gây ra các

điểm tăng nhiệt độ cục bộ bên trong vật liệu, đồng thời sóng siêu âm làm hình thành các bóng khí sinh nhiệt dẫn đến phá hủy cấu trúc tế bào, tạo ra sự dịch chuyển các hợp chất có tính phân cực. Điều này làm saponin hòa tan dễ dàng vào dung môi dưới tác động siêu âm.

Phạm Thị Mỹ Tiên và cộng sự (2021) [10]

trong nghiên cứu tách chiết saponin từ sâm Bồ Chính, 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 cho 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. Trong nhiều nghiên cứu khác, các tác giả cũng lựa chọn phương pháp siêu âm. Các tác giả Lau Aik-Jiang và cộng sự (2003) [20], Wan J.B. và cộng sự (2005) [9] cũng đã thực hiện nghiên cứu tách chiết saponin trên mẫu bột nguyên liệu khô, kết hợp phương pháp siêu âm ở nhiệt độ phòng cho hàm lượng saponin thu được cao khi định lượng trên hệ thống HPLC. Li Lie và cộng sự (2004) [21] đã sử dụng 5 mL dung dịch MeOH 80% cho 3 g bột *Panax notoginseng*, rung siêu âm ở các thời gian khác nhau 30, 60, 90 và 120 phút. Kết quả cho thấy chiết siêu âm 120 phút

tốt nhất và gần như không có saponin trong phần thải.

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. Chính vì vậy, chiết siêu âm được chọn làm phương pháp chiết xuất saponin tổng số từ sâm LC.

3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất saponin tổng số

Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian, nhiệt độ, loại dung môi, nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến quá trình chiết xuất saponin tổng số trong sâm LC. Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng được thể hiện tại Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các thông số chiết đến tỷ lệ saponin tổng số

Các yếu tố ảnh hưởng	Thông số	Tỷ lệ saponin tổng số chiết xuất so với dược liệu (%)
Loại dung môi	Nước	$11,38 \pm 0,27$
	Ethanol 30%	$12,73 \pm 0,35$
	Ethanol 50%	$13,06 \pm 0,33$
	Ethanol 70%	$14,21 \pm 0,44$
	Ethanol 90%	$13,88 \pm 0,41$
Kích thước nguyên liệu (mm)	0,5 - 1	$14,86 \pm 0,42$
	2 - 5	$12,05 \pm 0,30$
	6 - 10	$10,36 \pm 0,22$
Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	10/1	$14,86 \pm 0,32$
	20/1	$16,59 \pm 0,30$
	30/1	$16,06 \pm 0,40$
	40/1	$15,15 \pm 0,33$
Nhiệt độ chiết xuất (°C)	40	$13,86 \pm 0,28$
	50	$16,62 \pm 0,32$
	60	$14,98 \pm 0,30$
Thời gian siêu âm (phút)	10	$13,86 \pm 0,22$
	30	$15,95 \pm 0,33$
	50	$18,02 \pm 0,44$
	70	$18,06 \pm 0,42$
	90	$18,11 \pm 0,40$
Số lần chiết (lần)	1	$15,66 \pm 0,34$
	2	$18,02 \pm 0,44$
	3	$18,16 \pm 0,40$
	4	$18,18 \pm 0,42$

Các phân tử saponin mang nhiều nhóm phân cực nên chúng hòa tan tốt trong các dung môi

có độ phân cực cao như cồn và nước. Từ kết quả của thí nghiệm đã cho thấy nồng độ dung

môi ethanol 70% cho hàm lượng chiết xuất saponin đạt cao nhất 14,21%. Các tác giả Nguyễn Văn Bình và cộng sự (2020); Cao Ngọc Minh Trang và cộng sự (2023) [22, 23] cũng đã khảo sát và lựa chọn nồng độ ethanol 70% cho hiệu suất trích ly saponin trong hạt chôm chôm và cây cỏ mực đạt hàm lượng cao nhất lần lượt là 454, 33 (mg/g) và 15,46 (µg/mg). Với nồng độ cồn từ 60 và 70%, theo nghiên cứu của Joong-Ho Kwon và cộng sự (2003) [24] cũng cho hàm lượng saponin trong Nhân sâm Hàn Quốc cao nhất 294 và 299 (mg/g) khi có sự hỗ trợ của vi sóng với công suất 162 W.

Kích thước nguyên liệu từ 0,5-1 mm cho hiệu quả chiết xuất saponin cao nhất đạt 14,86%. Theo công bố của Nguyễn Văn Bình và cộng sự (2020) [22], kích thước nguyên liệu đạt 0,8 mm cũng cho hiệu suất chiết xuất saponin cao nhất. Tại kích thước lớn hơn mức độ phá vỡ của tế bào thấp, dẫn đến dung môi khó thấm vào bên trong nguyên liệu làm giảm khả năng trích. Vì vậy trong quá trình thực hiện nghiên cứu sẽ sử dụng bột mịn có kích cỡ nhỏ nhất 0,5 – 1 mm để đảm bảo hiệu quả của việc chiết xuất.

Với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: 20/1 (mL/g), cho tỷ lệ chiết saponin tổng số cao nhất thu được $16,59 \pm 0,3\%$, và giảm dần khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tăng. Tại tỷ lệ dung môi/nguyên liệu: 10/1 (mL/g), lượng dung môi quá ít không đủ để hòa tan mẫu dẫn đến hàm lượng saponin chỉ đạt $14,86 \pm 0,32\%$. Khi tăng tỷ lệ lên 20/1 và 30/1 hàm lượng saponin tăng lên đáng kể do lượng dung môi càng lớn thì khả năng thẩm thấu vào nguyên liệu và khả năng hòa tan các hợp chất vào dung môi sẽ tăng lên làm tăng tốc độ khuếch tán và hiệu suất trích ly. Kết quả đã cho thấy khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đạt đến mức bão hòa có thể làm giảm hiệu suất tách chiết và lãng phí nguồn nguyên liệu. Joong-Ho Kwon và cộng sự (2003) [24] cũng cho kết quả tương tự khi tách chiết saponin trong sâm Hàn Quốc với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20/1 cho hàm lượng saponin thu được cao nhất 4,40 %. Các tác giả Lê Thị Thanh Thảo và cộng sự (2019); Cao Ngọc Minh Trang và cộng sự (2023) [23, 25] sau khi

khảo sát các mức tỷ lệ khác nhau cho việc tách chiết saponin từ lá đu đủ rừng nhận thấy để đảm bảo hiệu quả chiết xuất và kinh tế, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 15/1 cho hàm lượng saponin cao nhất đạt lần lượt 19,02 (mg/g) và 15,48 (µg/mg).

Nhiệt độ khi siêu âm cũng ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng saponin thu được và đạt cao nhất với nhiệt độ 50°C cho hàm lượng saponin $16,62 \pm 0,32\%$. Tuy nhiên sau đó hàm lượng saponin giảm xuống $14,98 \pm 0,30$ tại 60 °C. Điều này có thể được giải thích là do trong quá trình chiết bằng dung môi ethanol: nước, khi tăng nhiệt độ làm cho động học của quá trình chiết cũng tăng lên và các chất được chiết ra khỏi tế bào tốt hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ càng tăng, một số chất có thể bị phân hủy, đồng thời nồng độ của các chất có mặt trong dung môi chiết tăng dần đến bão hòa và làm giảm khả năng chiết. Ngoài ra, hàm lượng saponin giảm dần khi tăng nhiệt độ chiết lên 60°C, 70°C ảnh hưởng đến mức độ bay hơi của dung môi.

Kết quả Bảng 3 cũng cho thấy tỷ lệ saponin tăng mạnh từ 13,86% lên 18,02% khi tăng thời gian siêu âm từ 10-50 phút, tuy nhiên khi tăng thời gian siêu âm từ 50-90 phút tỷ lệ saponin tổng số chiết suất được tăng lên không đáng kể (18,11% với thời gian siêu âm 90 phút). Các công bố cho thấy các tế bào có thể bị phá vỡ với tỷ lệ cao hơn khi thời gian xử lý siêu âm kéo dài làm hiệu suất trích ly sẽ tăng (Xiang L và cộng sự, 2010) [26]. 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 thu được (Ji J. B và cộng sự, 2006) [27]. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Sun và cộng sự (2021) [28] khi nghiên cứu chiết saponin từ lá cây táo tàu (*Zizyphus jujube* Mill var. *spinosa*) với sự hỗ trợ của siêu âm, 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. Tương tự như vậy, càng chiết nhiều lần hiệu suất thu nhận saponin càng tăng nhưng khi chiết 3-4 lần hàm lượng saponin tăng lên không đáng kể so với chiết 2 lần. Như vậy

lựa chọn 2 lần chiết sẽ tiết kiệm dung môi và năng lượng cho quá trình chiết xuất saponin từ sâm LC.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện tách chiết saponin tổng số từ sâm LC

Từ kết quả khảo sát 6 yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết xuất saponin tổng số ở Bảng 3 nhận thấy kích thước của nguyên liệu là điều kiện dễ dàng xử lý để đảm bảo hiệu quả chiết xuất và không tốn kém về mặt chi phí. Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; nồng độ ethanol và thời

gian siêu âm có ảnh hưởng lớn nhất đến hiệu suất tách chiết saponin tổng số từ sâm LC. Với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 10/1-30/1 (mL/g); nồng độ ethanol 50-90%; thời gian siêu âm 10-60 phút; công suất 25%; nhiệt độ 50°C hàm lượng saponin tổng số thu được cao nhất sau 2 lần chiết (18,02%). Các khoảng giá trị khác cho hàm lượng saponin thấp hơn. Như vậy, khoảng hoạt động tương ứng của các thông số khảo sát để tối ưu hóa hàm lượng saponin được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Các yếu tố tối ưu trong nghiên cứu chiết saponin tổng số

Biến số	Yếu tố	Đơn vị	Mức -1	Mức +1
X ₁	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	mL/g	5	30
X ₂	Nồng độ ethanol	%	50	85
X ₃	Thời gian siêu âm	phút	10	60

Ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (X₁), nồng độ ethanol (X₂), thời gian siêu âm (X₃) được xác định theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bậc hai để tối ưu

điều kiện tách chiết saponin tổng số theo 17 thí nghiệm được thiết kế bởi phần mềm DX13. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Ma trận thực nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất saponin

TT	Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (mL/g)	Nồng độ ethanol (%)	Thời gian siêu âm (phút)	Hàm lượng Saponin tổng số (g/100g)
1	5,0	85,0	35	7,54
2	17,5	67,5	35	18,86
3	17,5	85,0	10	7,66
4	5,0	67,5	60	10,04
5	17,5	67,5	35	19,95
6	17,5	67,5	35	20,55
7	30,0	67,5	10	14,20
8	17,5	67,5	35	17,83
9	17,5	85,0	60	19,02
10	17,5	50,0	10	11,56
11	30,0	50,0	35	8,45
12	5,0	67,5	10	4,88
13	17,5	67,5	35	19,64
14	17,5	50,0	60	8,19
15	5,0	50,0	35	5,40
16	30,0	67,5	60	14,88
17	30,0	85,0	35	20,42

Kết quả phân tích phương sai của mô hình tối ưu bằng phần mềm Design expert 13 trình bày trong Hình 1 (bên trái) cho thấy cả 3 yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nồng độ ethanol và

thời gian đều ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết xuất saponin (giá trị p của X₁, X₂, X₃ <0,05). Giá trị F của mô hình là 34,43; p = 0,0004 (p<0,05) cho thấy dạng mô hình đã được lựa

chọn đúng. Giá trị p của “Không tương thích” là 0,2271 ($p > 0,05$) cho thấy mô hình này tương hợp với thực nghiệm.

Phương trình hồi quy biểu diễn hàm lượng saponin (Y_s) mô tả ảnh hưởng của các yếu tố như sau:

$$Y_s = +19,37 + 3,76 \cdot X_1 + 2,63 \cdot X_2 + 1,73 \cdot X_3 + 2,46 \cdot X_1 X_2 - 1,12 \cdot X_1 X_3 + 3,68 \cdot X_2 X_3 - 4,76 X_1^2 - 4,15 X_2^2 - 3,61 X_3^2,$$

Trong đó:

Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (X_1);

Nồng độ ethanol (X_2);

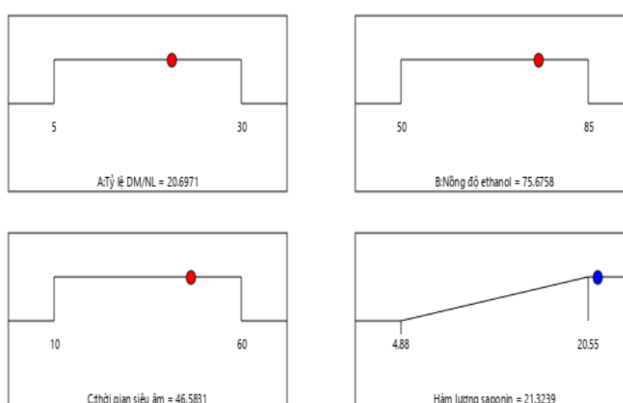
Thời gian siêu âm (X_3).

Tối ưu hóa hàm lượng saponin tổng số thu được từ mẫu sâm LC bằng hàm kỳ vọng (Hình 1-bên phải) cho thấy điều kiện chiết như sau: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu = 20,7/1 (mL/g), nồng độ ethanol 75,7% và thời gian siêu âm 46,5 phút.

Thực nghiệm tại điều kiện tỷ lệ dung môi/nguyên liệu = 20/1 (mL/g), nồng độ ethanol 75% và thời gian siêu âm 47 phút, hàm lượng

saponin thu được là 21,08 g/100 g, có độ tương thích cao so với lý thuyết. Tiếp theo đó, dịch chiết được lọc qua màng 0,45 μ m và chạy HPLC, kết quả cho thấy với sâm Lai Châu hàm lượng ginsenosid Rg1 6,3 g/100 g, Rb1 2,8 g/100 g và MR2 8,4 g/100 g. Hàm lượng saponin từ mẫu nghiên cứu tương đương với các công bố về hàm lượng saponin trong sâm LC - mẫu thu được ở tự nhiên có hàm lượng saponin tổng số ~ 23%) cao hơn mẫu trồng ~ 18,47% (Trần Thị Kim Hương và cộng sự, 2019) [7].

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	524.35	9	58.26	34.43	< 0.0001	significant
A-Tỷ lệ DM/NL	113.18	1	113.18	66.87	< 0.0001	
B-Nồng độ ethanol	55.34	1	55.34	32.70	0.0007	
C-thời gian siêu âm	23.91	1	23.91	14.13	0.0071	
AB	24.16	1	24.16	14.27	0.0069	
AC	5.02	1	5.02	2.96	0.1288	
BC	54.24	1	54.24	32.05	0.0008	
A ²	95.42	1	95.42	56.38	0.0001	
B ²	72.62	1	72.62	42.91	0.0003	
C ²	54.74	1	54.74	32.34	0.0007	
Residual	11.85	7	1.69			
Lack of Fit	7.41	3	2.47	2.23	0.2271	not significant
Pure Error	4.43	4	1.11			
Cor Total	536.20	16				



Hình 1. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình (hình trái) và điều kiện tối ưu để tách saponin (hình phải)

Với điều kiện nghiên cứu tối ưu thu được cho thấy với mẫu sâm LC (*Panax vietnamensis* var *fuscidicus* K, Komatsu, S, Zhu & S, Q, Cai -

một thứ khác của sâm Ngọc Linh) có hàm lượng saponin thu được gần tương đương với sâm Ngọc Linh theo công bố của Đinh Xuân Tú và

cộng sự (2023) [29], hàm lượng saponin tổng số của 20 mẫu đại diện thuộc 4 quần thể sâm Ngọc Linh 6 năm tuổi tại huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam có hàm lượng hoạt chất saponin tổng số 14 – 20%. Trong khi đó, với sâm Bồ Chính, Phạm Thị Mỹ Tiên và cộng sự (2021) [10] công bố điều kiện tối ưu cho tách chiết saponin tổng số bao gồm: thời gian siêu âm 11,4 phút, công suất siêu âm 57,2 W/g và thời gian 17,3 phút, hàm lượng saponin tổng đạt giá trị cực đại $2,577 \pm 0,056$ g/100 g.

Áp dụng điều kiện tối ưu thu nhận saponin trên với mẫu sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng*), kết quả thu được hàm lượng saponin trung bình $5,89 \pm 0,16$ g/100 g, tương tự như nghiên cứu về hàm lượng saponin tổng số có trong củ của cây sâm Hàn Quốc của Nguyễn Thượng Dong và cộng sự (2007) [30].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được phương pháp chiết và các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất saponin, cho hiệu quả chiết xuất cao và đảm bảo các yếu tố liên quan (hiệu suất, chi phí) là: phương pháp siêu âm, sử dụng dung môi ethanol 70%, kích thước nguyên liệu 0,5-1 mm, dung môi/nguyên liệu 20/1 (mL/g), tại nhiệt độ 50°C trong thời gian 50 phút với 2 lần chiết xuất.

Đồng thời đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình tách chiết saponin tổng số từ sâm LC bằng dung môi là ethanol kết hợp phương pháp siêu âm là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu = 20/1 (mL/g), nồng độ ethanol 75% và thời gian siêu âm 47 phút, hàm lượng saponin thu được là 21,08 g/100 g. Kết quả thu được là cơ sở để xây dựng quy trình tách chiết và định lượng saponin tổng số từ sâm LC cũng như các loại nhân sâm nói chung.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu kỹ thuật tách chiết và định lượng một số hợp chất từ dược liệu trên hệ thống HPLC - PDA” của Trường Đại học Lâm nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Wang J., Qiao L., Li S. & Yang G. (2013). Protective effect of ginsenosid Rb1 against lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Molecules*. 18: 1214-1226.
- [2]. Mahady G.B., Gyllenhaal C., Fong H.H.S. & Farnsworth N.R. (2000). Ginseng: a review of safety and efficacy. *Nutr Clin Car*. 3(2): 90-101.
- [3]. Choi H.I., Kim N.H., Kim J.H., Choi B.S., Ahn I.O., Lee J.S. & Yang T.J. (2011). Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in *Panax ginseng* cultivars and related species. *Journal of Ginseng Research*. 35(4): 399-412.
- [4]. Fernandez-Moriano C., Gonzalez-Burgos E., Iglesias I., Lozano R. & Gómez-Serranillos M.P. (2017). Evaluation of the adaptogenic potential exerted by ginsenosides Rb1 and Rg1 against oxidative stress mediated neurotoxicity in an in vitro neuronal model. *PLoS One*. 12(8): e0182933.
- [5]. Lee Y.Y., Kim S.D., Park S.C. & Rhee M.H. (2021). *Panax ginseng*: inflammation, platelet aggregation, thrombus formation, and atherosclerosis crosstalk. *Journal of Ginseng Research*. 46: 54-61.
- [6]. Đỗ Thị Hà, Vũ Thị Diệp, Lê Thị Loan, Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Minh Khởi, Phạm Quang Tuyến & Trần Thị Kim Hương (2016). Một số kết quả bước đầu nghiên cứu thành phần hoá học, xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và dấu vân tay hoá học sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var., *fuscidiscus*). Báo cáo hội thảo Bảo tồn và phát triển sâm Lai Châu tại huyện Mường Tè), Viện Dược liệu và Viện Nghiên cứu Lâm sinh.
- [7]. Trần Thị Kim Hương, Hà Thị Thanh Bình, Nguyễn Mai Thơm & Đào Thu Huế (2019). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật trồng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var *fuscidicus* K., Komatsu, S., Zhu & S.Q.Cai) tại Lai Châu. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 17(7): 588-593.
- [8]. Yang Y, Ju Z, Yang Y, Zhang Y, Yang L & Wang Z (2021). Phytochemical analysis of *Panax* species: a review. *Journal of Ginseng Research*. 45: 1–21.
- [9]. Wan J.B., Lai C.M., Li S.P., Lee Y.M., Kong L.Y. & Wang Y.T. (2005). Simultaneous determination of nine saponins from *Panax notoginseng* using HPLC and pressurized liquid extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 274–279.
- [10]. 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 (2021). 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 bồ chính (*Abelmoschus sagittifolius*). *Tạp*

chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm. 21(3): 212-223.

[11]. Trương Hoàng Duy, Lê Phạm Tấn Quốc, Trần Thị Hồng Cẩm, Phạm Thị Kim Ngọc & Đồng Thị Anh Đào (2015). Tối ưu hóa trích ly thu nhận dịch Saponin thô từ đảng sâm *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. F. bằng enzyme alpha – Amylase. Đặc san Thông tin Khoa học Công nghệ. 99: 1-3.

[12]. Jianyong Wu, Lidong Lin & Foo-tim Chau. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells (2001). Ultrasonics sonochemistry. 8: 347-352.

[13]. Trinh Thi Thuy, Nguyen Huy Cuong & Tran Van Sung (2007). Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth. Journal of Chemistry. 45(3): 373 – 376.

[14]. Liu Y., Li Z., Xu H. & Han Y. (2016). Extraction of saponin from *Camellia oleifera* Abel Cake by a combination method of alkali solution and acid isolation. Journal of Chemistry. 10: 1-8.

[15]. Nguyen Van Ban, Huynh Thanh Duy, Tran Hai Duong, Tran Thi Tuyen Nhung, Thach Trong Nghia, Nguyen Duc Do & Huynh Ngoc Thanh Tam (2018). Surveying the contents of polyphenol, saponin, antioxidant and antibacterial activity in *Colocasia esculenta*. Journal of Agricultural Science and Technology. 2(3): 831-838.

[16]. Hoàng Thị Thùy Trang, Nguyễn Thị Thu Huyền & Hoàng Thị Ngọc Nhơn (2020). Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly saponin và khả năng kháng oxy hóa của dịch trích rễ đảng sâm bằng phương pháp trích ly hỗ trợ enzyme. Tạp chí Công thương. 18(7): 100-106.

[17]. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên, Phạm Thế Hải & Phạm Hương Sơn (2017). Đánh giá sinh trưởng và thành phần hoạt chất của Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) trồng ở Quảng Nam. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 33(2S): 227-232.

[18]. Bùi Thế Vinh & Võ Sỹ Nhật (2023). Đặc điểm dấu vân tay TLC và HPLC của ginsenoside có trong một số loài thuộc chi *Panax*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng. 24: 109-116.

[19]. Dam Thi Thu, Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Thi Thanh Phuong, Nguyen Thi Hong Hanh & Nguyen Thanh Dat (2021). Simultaneous determination of notoginsenoside R1 and ginsenosides Rg1, Re, Rb1 in dietary supplements by HPLC-DAD. Vietnamese Journal of Food Control. 4(2): 160 - 170.

[20]. Lau A.J, Woo S.O. & Koh H.L. (2003). Analysis of saponins in raw and steamed *Panax notoginseng* using high-performance liquid chromatography with diode

array detection. Journal of Chromatography A. 1011(1): 77-87.

[21]. Li L., Zhang J.L., Sheng Y.X., Ye G., Guo H.Z. & Guo D.A (2004). Liquid chromatographic method for determination of four active saponins from *Panax notoginseng* in rat urine using solid-phase extraction. Journal of Chromatography B. 808(2): 177–183.

[22]. Nguyễn Văn Bình & Phạm Thị Phương (2020). Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết saponin từ hạt chôm chôm. Tạp chí Khoa học Tân Trào. 17: 42-46.

[23]. Cao Ngọc Minh Trang, Trịnh Phương Trang, Nguyễn Nhật Huỳnh, Sen Liên Phương, Võ Lê Anh Thi & Nguyễn Thảo Vy (2023). Khảo sát điều kiện tách chiết và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết từ cây cỏ mực (*Eclipta prostrata* L.) mọc tại Long An. Tạp chí Khoa học Đại học Văn Lang. 124-131.

[24]. Joong-Ho Kwon, Gee-Dong Lee, Jacqueline M. R. Be'langer & J. R. Jocelyn Pare (2003). Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using microwave-assisted process (MAPTM). International Journal of Food Science and Technology. 38: 615–622.

[25]. Lê Thị Thanh Thảo, Lê Thị Thanh Thảo, Nguyễn Trọng Điệp, Nguyễn Hồng Vân Võ Xuân Minh & Nguyễn Nữ Huyền My (2019). Xây dựng quy trình chiết xuất saponin toàn phần từ lá đu đủ rừng bằng phương pháp chiết siêu âm. Tạp chí Y – Dược học Quân sự. 9: 17-22.

[26]. Xiang L., Jian-zhong M., Jing X. & Yun-dong S. (2010). A study on the extraction and purification technology of tea sapogenin. African Journal of Biotechnology. 9(18): 2691-2696.

[27]. Ji J.B., Lu X.H., Cai M.Q. & Xu X.C. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry. 13(5): 455-462.

[28]. Sun Y., Zhang Y., Qi W., Xie J. & Cui X. (2021). 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): 541-554.

[29]. Đinh Xuân Tú, Trịnh Minh Quý, Hồ Thị Hoa & Nguyễn Minh Lý (2023). Đánh giá nguồn vật liệu khởi đầu phục vụ công tác chọn tạo giống sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) tại tỉnh Quảng Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 2(144): 19 – 29.

[30]. Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận & Nguyễn Thị Hương (2007). Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ nhân sâm. Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.