

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY SAPONINS TỪ DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*) VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA VI SÓNG VÀ ENZYME

Nguyễn Thị Hải Hoà, Trần Thị Thu Phương, Trần Thị Bích Trâm,
Hoàng Thị Ngọc Nhơn*

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 08/10/2024; Ngày nhận bài sửa: 11/11/2024; Ngày chấp nhận đăng: 18/11/2024

TÓM TẮT

Từ lâu, các nguồn thảo mộc tự nhiên đã được biết đến là kho tàng chứa đựng các hợp chất sở hữu hoạt tính sinh học đa dạng. Trong đó, saponins nổi lên như một phân lớp điển hình, thu hút sự chú ý đặc biệt của giới y học hiện đại nhờ những tác động tích cực đến hệ thống sinh lý cơ thể. Sở hữu những giá trị dược lý thiết thực đã được chứng minh, Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) từ lâu đã là đối tượng thảo mộc được tin dùng trong y học cổ truyền với tiềm năng trị liệu cực kỳ to lớn. Nhằm khai thác tối đa những lợi thế sinh học này, nghiên cứu hiện tại tập trung đánh giá vai trò của các tác nhân xử lý sơ bộ bao gồm vi sóng, enzyme, sự kết hợp vi sóng-enzyme đến hiệu quả trích ly saponins từ *P. amarus*. Sử dụng phương pháp chiết vi sóng hàm lượng saponins thu được là $29,08 \pm 0,79$ mg/g CK với điều kiện công suất 360 W trong thời gian 90 s. Hàm lượng saponins thu được bằng phương pháp chiết với enzyme là $23,42 \pm 1,09$ mg/g CK với điều kiện: nồng độ enzyme 0,8% (v/w) kết hợp cùng giá trị pH 5,5 và với tổng thời gian ủ nhiệt là 90 phút. Và đối với phương pháp chiết vi sóng kết hợp enzyme, hàm lượng saponins thu được là $34,75 \pm 1,05$ mg/g CK với điều kiện công suất 270 W trong thời gian 60 s.

Từ khóa: *Phyllanthus amarus*, saponins, vi sóng, Viscozyme L.

1. MỞ ĐẦU

Trong bối cảnh hiện nay, xu hướng khai thác các hợp chất chiết xuất từ tự nhiên nhằm phục vụ mục tiêu chăm sóc và bảo vệ sức khỏe đang ngày càng nhận được sự quan tâm sâu sắc. Nhiều báo cáo khoa học đã xác nhận rằng các thành phần sinh học có nguồn gốc thực vật sở hữu phổ tác dụng dược lý cực kỳ phong phú, nổi bật với các đặc tính như ức chế quá trình oxy hóa, kháng viêm, tiêu diệt vi sinh vật gây hại và hỗ trợ ngăn ngừa nhiều bệnh lý mãn tính. Chính vì thế, giới thực vật được nhìn nhận là nguồn tài liệu sinh học vô cùng tiềm năng cho công tác nghiên cứu và phát triển các hoạt chất mới trong các lĩnh vực y dược cũng như công nghệ thực phẩm hiện đại. Trong đó, chi *Phyllanthus* là một ví dụ điển hình với sự phân bố địa lý rộng khắp tại các vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới trên toàn cầu, đồng thời được ghi nhận có mức độ đa dạng sinh học cao. Theo các tài liệu phân loại thực vật, chi này hiện có hơn 700 loài đã được ghi nhận, trong đó tại Việt Nam có khoảng 44 loài [1]. Trong chi này, *Phyllanthus amarus* (*P. amarus*) là loài được tập trung nghiên cứu nhất nhờ sự phổ biến trong tự nhiên và giá trị dược lý tiềm năng. Các nghiên cứu hóa thực vật cho thấy *P. amarus* chứa nhiều nhóm hợp chất sinh học quan trọng như flavonoid, acid carboxylic, tannin, coumarin, lignans corilagin, acid gallic, acid caffeoylquinic, geraniin và rutinhave .v.v. [2]. Ngoài ra, nhiều công trình nghiên cứu cũng ghi nhận khả năng của saponins trong việc ngăn chặn phản ứng viêm, ức chế stress oxy hóa và thể hiện độc tính đối với các tế bào ung thư [3]. Bên cạnh đó, saponins còn được ghi nhận có khả năng bảo vệ gan [4], đồng thời thể hiện hoạt tính kháng virus và kháng khuẩn [5]. Saponins là các glycoside tự nhiên thường gặp trong giới thực vật, được hình thành thông qua quá trình chuyển hóa thứ cấp của cây. Với cấu trúc hóa học đặc thù, nhóm hợp chất này bộc lộ nhiều đặc tính dược lý giá trị, tiêu biểu là khả năng kháng khuẩn [6], và kim hãm sự tăng sinh của các dòng tế bào ác tính [7]. Một số loài thực vật giàu saponins như cam thảo và nhân sâm đã được khai thác rộng rãi làm nguồn dược liệu có giá trị trong y học [8].

Hiệu quả thu nhận saponins từ nguyên liệu thực vật bị chi phối bởi hàng loạt các tác nhân, trong đó phương pháp chiết xuất đóng vai trò đặc biệt quan trọng. Việc ứng dụng các dung môi hữu cơ trong quy trình chiết tách truyền thống vốn đã được áp dụng rộng rãi, điển hình là công trình của Nguyễn Văn Tăng cùng các cộng sự về trích ly saponins từ vỏ quả ca cao [9]. Song song đó, việc ứng dụng năng lượng vi sóng và xúc tác enzyme vào quy trình chiết tách đang trở thành hướng đi mới để cải thiện hiệu suất chiết các hợp chất tự nhiên. Ví dụ, phương pháp chiết xuất hỗ trợ enzyme đã được áp dụng cho *Codonopsis javanica* [10], hay chiết xuất hỗ trợ vi sóng được nghiên cứu trên *Musa balbisiana* [11]. Ngoài ra, việc kết hợp giữa vi sóng-enzyme được xem là một hướng tiếp cận hiệu quả giúp cải thiện quá trình phá vỡ cấu trúc mô thực vật, qua đó tối đa hóa hàm lượng các hợp chất sinh học được chiết ra. Trên cơ sở này, đề tài được triển khai nhằm phân tích ảnh hưởng của các điều kiện kỹ thuật đến quá trình trích ly saponins từ *P. amarus* bằng các phương pháp chiết xuất hỗ trợ vi sóng, enzyme và sự kết hợp giữa hai phương pháp này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu

Đối tượng khảo sát chính trong thực nghiệm này là toàn bộ cây *P. amarus* trưởng thành, có chiều cao trung bình khoảng 30 cm và không bị héo úa. Mẫu được thu hái tại huyện Dầu Tiếng, tỉnh Bình Dương và được chuyên ngay về phòng thí nghiệm trong ngày để bắt đầu các bước sơ chế. Tại đây, mẫu được làm sạch nhằm loại trừ tạp chất, sau đó trải qua quá trình sấy nhiệt bằng thiết bị chuyên dụng (UF110, Đức) tại 60 °C. Quá trình này duy trì cho tới khi độ ẩm còn lại của nguyên liệu đạt mức dưới 10%, với thông số này được kiểm soát chính xác thông qua cân sấy ẩm hồng ngoại (MB120, Trung Quốc) ở 105 °C. Nguyên liệu *P. amarus* được xay mịn bằng máy xay cơ học (VNS-2500, Trung Quốc), tiếp tục sàng qua rây có kích thước 0,3 mm để tạo ra bột nguyên liệu đồng nhất. Bột được bảo quản trong túi PE dày ở -20 °C, tránh quang hóa và được dùng làm nguồn nguyên liệu đồng nhất cho toàn bộ các công đoạn nghiên cứu.

Hóa chất

Enzyme Viscozyme L được cung cấp bởi Novozymes (Copenhagen, Đan Mạch) với điều kiện hoạt động tối thích được khuyến cáo trong khoảng 40-50 °C và pH từ 4-5,5, vanillin (99%, Đức), ethyl acetate (99,5%, Nhật Bản), acid perchloric (70%, Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát tác động của vi sóng lên quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Lấy 1 g mẫu nguyên liệu (tính theo % khối lượng chất khô, CK) vào beaker, thêm nước cất (1/20 w/v). Mẫu được xử lý bằng vi sóng với công suất (180, 270, 360, 450, 540 W) trong thời gian (30, 60, 90, 120, 150 s). Lò vi sóng (EMM2308X, Trung Quốc) được bật nguồn trong 45 s để làm nóng, cho mẫu vào, bật nguồn trong 5 s và tắt nguồn trong 5 s, duy trì liên tục cho tới khi kết thúc thời gian theo dõi. Kết thúc giai đoạn xử lý vi sóng, mẫu được ủ nhiệt tại 50 °C trong 60 phút bằng thiết bị ổn nhiệt (IKA, Đức) để tối ưu hóa quá trình trích ly [12]. Hỗn hợp sau đó được ly tâm (Z206A, Đức) tại tốc độ 5000 vòng/phút trong 15 phút nhằm tách thu dịch chiết. Hàm lượng saponins tổng số được xác định thông qua phép đo quang phổ UV-Vis (WTW, Đức) tại bước sóng 550 nm [13]. Mọi thực nghiệm đều được thực hiện lặp lại 3 lần để đảm bảo tính khách quan.

2.2.2. Khảo sát tác động của enzyme lên quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Lấy 1g mẫu nguyên liệu (tính theo % khối lượng CK) vào beaker, thêm dung dịch đệm natri acetate 50 mM để hiệu chỉnh pH (1/20 w/v). Các thông số chiết xuất được khảo sát lần lượt với nồng độ enzyme (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1% v/w), pH (4; 4,5; 5; 5,5; 6) và thời gian (30, 60, 90, 120 và 150 phút). Mẫu được cho vào bồn ổn nhiệt cố định 50 °C (IKA, Đức) trong 60 phút để chiết xuất [12]. Ngay sau đó, quá trình vi sóng enzyme được thực hiện tại 90 °C trong vòng 5 phút nhằm ổn định dịch chiết [14]. Hỗn hợp tiếp tục được phân tách bằng máy ly tâm (Z206A, Đức) ở điều kiện 5000 vòng/phút trong 15 phút để thu hồi pha lỏng. Hàm lượng saponins tổng số được định lượng thông qua phương pháp đo phổ hấp thụ UV-Vis (WTW, Đức) tại đỉnh 550 nm [13]. Toàn bộ các quy trình thực nghiệm đều được tiến hành lặp lại 3 lần độc lập.

2.2.3. Khảo sát tác động của vi sóng và enzyme lên quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Lấy 1 g mẫu nguyên liệu (tính theo % khối lượng CK) vào beaker, thêm dung dịch đệm natri acetate 50 mM để hiệu chỉnh pH 5,5 (1/20 w/v). Vi sóng được thực hiện với công suất (180, 270, 360, 450, 540 W) trong thời gian (30, 60, 90, 120, 150 s). Lò vi sóng (EMM2308X, Trung Quốc) được làm nóng trong 45 s, cho mẫu vào bật nguồn trong 5 s và tắt nguồn trong 5 s, tiến hành tương tự cho tới khi kết thúc lộ trình thực nghiệm. Sau khi vi sóng, bổ sung Viscozyme L với hàm lượng được xác định từ thí nghiệm khảo sát nồng độ enzyme (v/w) và cho mẫu vào bồn ổn nhiệt cố định 50 °C (IKA, Đức) trong 60 phút để tiếp tục chiết xuất [12]. Kế đó, nhằm đình chỉ hoạt tính của enzyme, dịch chiết được gia nhiệt tại 90 °C trong khoảng thời gian 5 phút [14]. Ở bước hoàn tất, hỗn hợp được đem đi ly tâm phân tách (Z206A, Đức) với cường độ 5000 vòng/phút trong 15 phút để thu lấy dịch trong. Lượng saponins được thực tương tự như trên [13]. Nghiên cứu được lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Phương pháp xác định hàm lượng saponins

Quy trình xác định hàm lượng saponins tổng trong nghiên cứu này tuân thủ theo các chỉ dẫn của Zhaobao và cộng sự [13]. Cụ thể, 0,3 mL dịch trích được hút vào bình định mức 10 mL, sau đó bổ sung 0,3 mL vanillin pha bằng acid acetic 5% và 1 mL HClO₄. Dung dịch sau đó được duy trì ở nhiệt độ 70 °C trong vòng 15 phút. Kết thúc quá trình gia nhiệt, hỗn hợp được làm lạnh nhanh về nhiệt độ phòng trước khi tiến hành định mức đến thể tích 10 mL bằng ethyl acetate. Cuối cùng, độ hấp thụ quang của mẫu được xác định tại bước sóng 550 nm. Hàm lượng saponins tổng được biểu thị theo đơn vị mg/g CK và được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng saponins} = \frac{C.n.V.100}{M.(100-h)}$$

Trong đó, C: tổng hàm lượng saponins theo acid oleanolic (mg/mL), V: thể tích dung môi dùng để trích ly (mL); M: khối lượng nguyên liệu trích ly (g); n: hệ số pha loãng; h: độ ẩm (%).

2.3.2. Phương pháp đo kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscope – SEM)

Để làm rõ những thay đổi cấu trúc sau thủy phân, kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) model JEOL JSM-7600F đã được sử dụng để quan sát bề mặt nguyên liệu. Công tác thực nghiệm này được tiến hành với sự hỗ trợ từ Trung tâm Công nghệ Việt Đức thuộc Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. Phương pháp xử lý dữ liệu

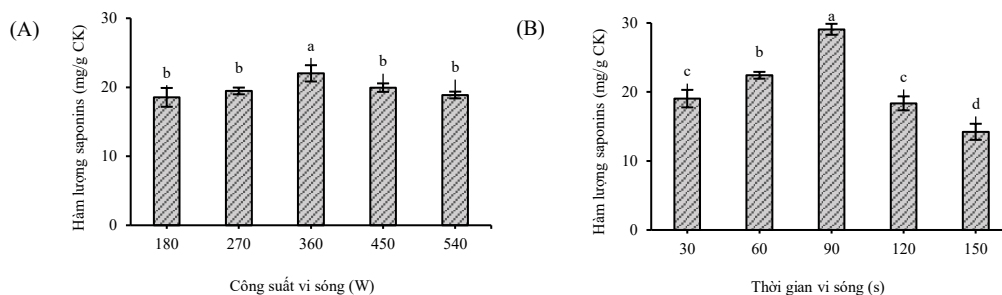
Dữ liệu thực nghiệm được trình bày dưới dạng số trung bình cộng kết hợp với độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Để xác định ý nghĩa thống kê và sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm, phần mềm Minitab 19 đã được ứng dụng để phân tích. Đồng thời, các đồ thị biểu diễn xu hướng và kết quả nghiên cứu được thiết lập thông qua công cụ Microsoft Excel 2019.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tác động của vi sóng đến quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Saponins tan tốt trong các dung môi phân cực [15]. Để tăng khả năng chiết xuất, vi sóng đã được áp dụng để phá vỡ tế bào, cho phép các thành phần nội bào được giải phóng vào dung môi đã lựa chọn. Công suất vi sóng tác động đáng kể đến quá trình chiết xuất vì nó tạo ra nhiệt trong quá trình chiết xuất thực tế. Kết quả được mô tả trong Hình 1-A. Hình 1-A cho thấy hàm lượng saponins của *P. amarus* tăng từ 180 W lên 270 W và đạt hàm lượng saponins cao nhất ở mức 360 W (22,02 ± 1,18 mg/g CK) nhưng giảm ở công suất cao hơn (450 và 540 W). Điều này là do hiệu ứng làm nóng, dẫn đến những thay đổi cấu trúc bên trong của tế bào và tăng áp suất bên trong. Tác động này giúp phá hủy vách tế bào, tạo điều kiện để các phân tử saponins khuếch tán dễ dàng hơn ra môi trường chiết. Tuy nhiên, mức nhiệt dư thừa từ vi sóng có thể gây nhiệt phân, làm tổn hại đến độ ổn định của các hợp chất sinh học. Vì vậy, công suất 360 W được chọn cho thí nghiệm tiếp theo. Phát hiện này có sự tương đồng với các công bố của Baoqin và cộng

sự, trong đó hiệu suất thu nhận saponins ở phút thứ 13 giảm khi công suất vi sóng từ 420-540 W. Do đó, lựa chọn cường độ vi sóng phù hợp đóng vai trò quyết định đến hiệu quả trích ly hợp chất này [16].



Hình 1. Kết quả khảo sát về tác động của công suất vi sóng (A) và thời gian vi sóng (B) đến hàm lượng saponins được chiết xuất từ *P. amarus*

Chú thích: Sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) giữa các mẫu trong cùng một đồ thị được ký hiệu bằng các chữ cái khác nhau

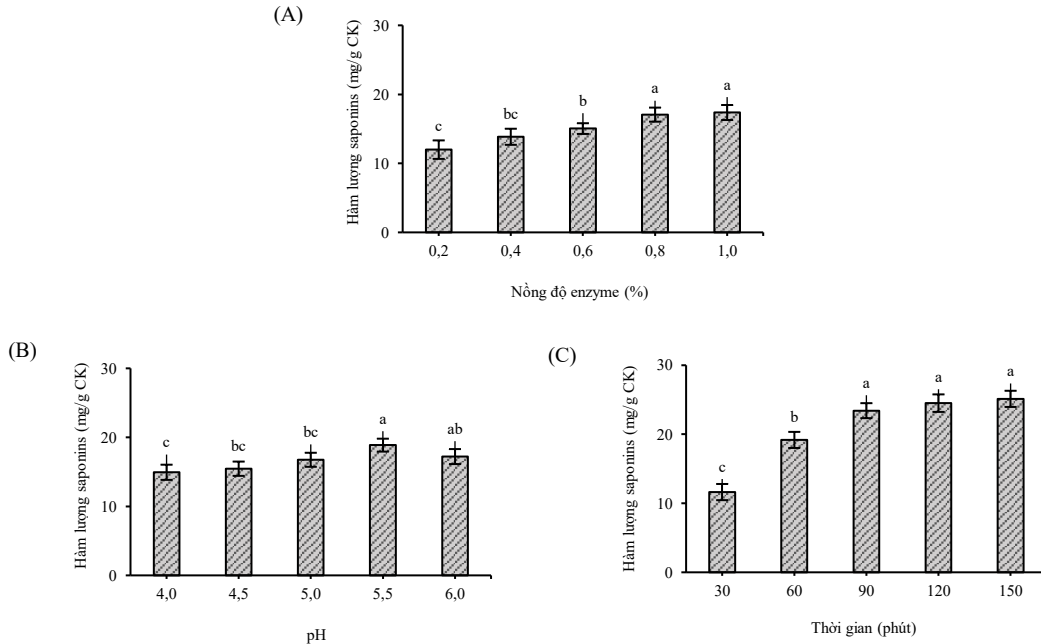
Ngoài cường độ vi sóng, thời lượng xử lý đóng vai trò quan trọng trong việc quyết định hàm lượng saponins được chiết tách từ nguyên liệu. Khi thời gian xử lý được kéo dài, năng lượng vi sóng có thêm thời gian tác động lên nguyên liệu, Hiện tượng này làm gia tăng sự phá hủy cấu trúc mô, từ đó thúc đẩy quá trình phát tán các hoạt chất sinh học vào pha lỏng. Dựa trên dữ liệu tại Hình 1-B, có thể thấy hàm lượng saponins thu được có xu hướng tăng dần khi thời gian chiếu tia vi sóng tăng từ 30 s đến 90 s. Giá trị cao nhất đạt được tại thời gian 90 s ($29,08 \pm 0,79$ mg/g CK). Tuy nhiên, khi thời gian vi sóng từ 120-150 s thì hàm lượng giảm xuống còn $14,22 \pm 1,17$ mg/g CK. Hiện tượng này có thể do quá trình gia nhiệt kéo dài làm suy giảm độ bền của một số hợp chất sinh học, dẫn đến sự phân hủy hoặc biến đổi cấu trúc của saponins. Kết quả thu được tương đồng với xu hướng được mô tả trong nghiên cứu của Sweeta và cộng sự rằng việc chiết xuất saponins từ hạt *Trigonella foenum-graecum* L. phụ thuộc vào thời gian vi sóng [17]. Do đó, thời gian vi sóng được chọn là 90 s.

3.2. Tác động của enzyme đến quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Thành tế bào thực vật được xem là ngăn trở chính đối với việc giải phóng các hoạt chất sinh học vào môi trường trích ly. Vì vậy, bên cạnh các kỹ thuật chiết xuất dung môi truyền thống, việc sử dụng một số loại enzyme hỗ trợ cho quá trình chiết xuất là một kỹ thuật chiến lược đang được triển khai rộng rãi trong các nghiên cứu về hợp chất tự nhiên, nhằm phân hủy thành tế bào đối với một số loài thực vật, cũng như tăng hiệu quả thu hồi chất chiết mà vẫn duy trì chất lượng của chiết xuất nhờ vào khả năng thúc đẩy các phản ứng hóa sinh [18]. Viscozyme L là một chế phẩm đa enzyme chứa cellulase, hemicellulase và các enzyme phụ trợ khác. Chúng thực hiện quá trình thủy phân ngẫu nhiên các liên kết β -1,4-O-glycoside trong mạch cellulose của vách tế bào thực vật, giải phóng các phân tử cello-oligosaccharide, cellobiose và glucose [19]. Nhờ khả năng phá vỡ cấu trúc mô bền vững, hệ enzyme này được ứng dụng rộng rãi để hỗ trợ thu hồi các hợp chất sinh học [20]. Trong đó, hiệu quả của phản ứng chịu sự chi phối trực tiếp bởi các thông số như nồng độ enzyme, độ pH và thời gian xử lý [21].

Do đó, việc khảo sát thực nghiệm các nhân tố này là cần thiết để tối ưu hóa quy trình trích ly saponins. Kết quả của nồng độ enzyme được thể hiện ở Hình 2-A. Khi tăng dần nồng độ enzyme từ 0,2 - 0,8% (v/w) hàm lượng saponins liên tục tăng từ $11,99 \pm 1,34$ mg/g CK đến $17,06 \pm 1,02$ mg/g CK. Hàm lượng saponins của *P. amarus* đạt giá trị cao nhất tại nồng độ 0,8% (v/w) ($17,06 \pm 1,02$ mg/g CK). Khi tăng nồng độ lên 1,0% (v/w) thì hàm lượng tăng $17,37 \pm 1,09$ mg/g CK nhưng kết quả không có sự khác biệt có ý nghĩa khi phân tích ANOVA ($p < 0,05$) so với kết quả ở nồng độ 0,8% (v/w). Khi nồng độ enzyme càng tăng tốc độ phản ứng enzyme với cơ chất càng nhanh làm phá hủy thành tế bào giải phóng các hợp chất sinh học khiến hiệu quả trích ly càng cao, khi nồng độ enzyme quá lớn dẫn đến nồng độ cơ chất bão hòa [22]. Càng tăng nồng độ enzyme thì quá trình trích ly càng nhanh, thành tế bào càng bị phá hủy nhiều khiến cho hiệu suất trích ly càng cao, tuy nhiên khi dùng quá nhiều enzyme thì hiệu suất trích ly không có xu hướng tăng, điều đó có thể giải thích do sự bão hòa giữa nguyên liệu và enzyme khiến hàm lượng chất tan trong nguyên liệu được trích ra ít dần và không tăng thêm nữa [23]. So với mẫu chiết không dùng enzyme, việc bổ sung Viscozyme L giúp cải thiện hiệu suất trích ly gấp

1,5 lần, một xu hướng đã được Phan Phước Hiền và cộng sự [10] báo cáo trước đây khi thực hiện nghiên cứu trên đối tượng *Codonopsis javanica*. Do đó, nồng độ enzyme 0,8% (v/w) được chọn để cố định ở nội dung nghiên cứu về chiết vi sóng và các khảo sát tiếp theo.



Hình 2. Kết quả khảo sát về tác động của nồng độ enzyme (A), pH (B) và thời gian (C) đến hàm lượng saponins chiết xuất từ *P. amarus*

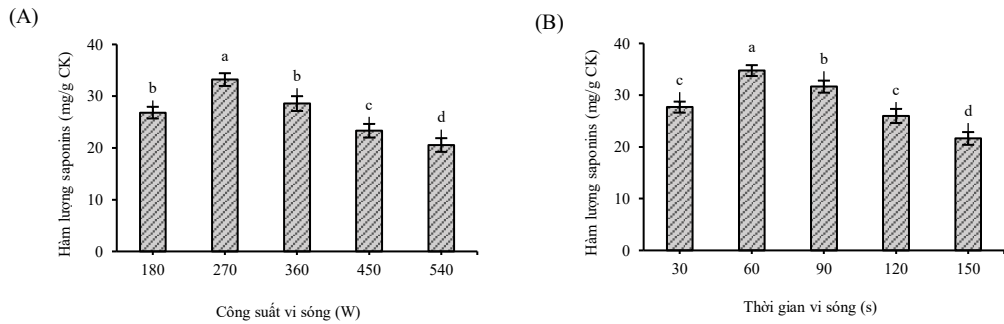
Chú thích: Trong cùng một biểu đồ, các ký tự khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trung bình $p < 0,05$

Kết quả khảo sát về tác động của độ pH đến quá trình chiết xuất saponins hỗ trợ enzyme được minh họa trong Hình 2-B. Khi độ pH tăng, hàm lượng saponins tăng liên tục từ 4,0 ($14,94 \pm 1,10$ mg/g CK) đến pH 5,0 ($16,75 \pm 1,02$ mg/g CK) và đạt cực đại tại pH 5,5 ($18,87 \pm 0,94$ mg/g CK). Tuy nhiên, khi pH tăng lên 6, hàm lượng saponins bắt đầu giảm xuống $17,21 \pm 1,09$ mg/g CK. Do mỗi loại enzyme đều có một khoảng pH tối thích để duy trì hoạt tính xúc tác cao nhất. Khi giá trị pH của môi trường phản ứng lệch khỏi khoảng tối thích này, có nguy cơ dẫn đến sự vô hoạt hóa enzyme do các biến đổi tiêu cực về mặt cấu trúc, kết quả tương đồng với bài nghiên cứu Rau đắng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) [24]. Vậy nên, vùng pH thích hợp để khảo sát là 5,5 vì nó gần với điểm pH của nguyên liệu đang khảo sát nhất.

Tác động của thời gian chiết xuất enzyme lên hàm lượng saponins của *P. amarus* được minh họa trong Hình 2-C. Các phát hiện chỉ ra rằng khi thời gian chiết xuất kéo dài, tốc độ phản ứng giữa enzyme và cơ chất cũng tăng lên. Ở thời gian 30-60 phút hàm lượng saponins tăng dần (từ $11,63 \pm 1,17$ mg/g CK đến $19,18 \pm 1,17$ mg/g CK) và hàm lượng saponins cao nhất là ở thời gian 90 phút là $23,42 \pm 1,09$ mg/g CK. Ở thời gian 120-150 phút hàm lượng saponins có xu hướng tăng nhưng giá trị thu được không khác biệt một cách đáng kể ở mức ý nghĩa 5% ($p > 0,05$) so với thời gian 90 phút. Việc tăng thời gian chiết xuất dẫn đến tương tác nhanh hơn giữa enzyme và các thành phần của thành tế bào, giúp tăng lượng chất được chiết xuất [25]. Tuy nhiên, với lượng enzyme và cơ chất có giới hạn trong hệ phản ứng, sẽ đến thời điểm mà phần lớn cơ chất đã được chuyển hóa. Ngoài ra, hoạt lực xúc tác của enzyme thường chỉ đạt trạng thái lý tưởng trong một khung thời gian giới hạn. Vì vậy, mốc 90 phút được xác định là thời điểm tối ưu để duy trì hiệu quả trích ly cho các khảo sát kế tiếp.

3.3. Tác động của vi sóng – enzyme đến quá trình chiết xuất saponins từ *P. amarus*

Dữ liệu về hiệu quả chiết tách saponins từ *P. amarus* bằng phương pháp hỗ trợ vi sóng - enzyme được đối chiếu và minh họa thông qua Hình 3 dưới đây.



Hình 3. Kết quả khảo sát về tác động của vi sóng và enzyme đến hàm lượng saponins chiết xuất từ *P. amarus* với công suất vi sóng (A) và thời gian vi sóng (B)

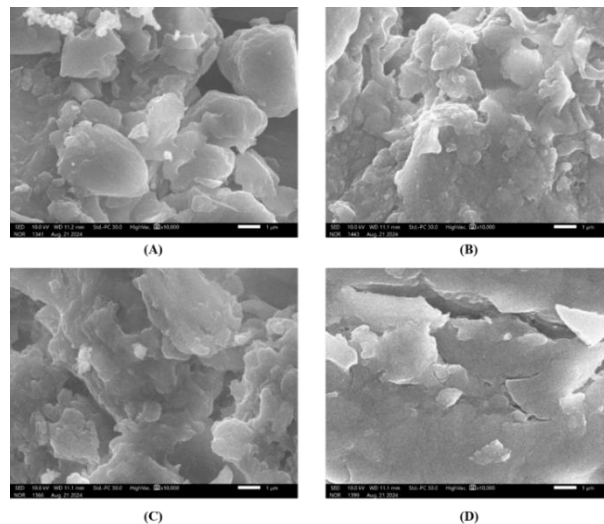
Chú thích: Các mẫu có ký hiệu chữ cái khác nhau trên cùng một biểu đồ thể hiện sai biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy 95% ($p < 0,05$)

Nghiên cứu cho thấy hàm lượng saponins của *P. amarus* tăng dần từ 180 đến 270 W, đạt giá trị đỉnh công suất 270 W ($33,21 \pm 1,23$ mg/g CK) (Hình 3-A). Đối với thời gian vi sóng, kết quả được trình bày ở Hình 3-B cho thấy khi tăng thời gian vi sóng từ 30 lên 60 s thì hàm lượng saponins của *P. amarus* đạt cao nhất ở mức 60 s ($34,75 \pm 1,05$ mg/g CK). Tuy nhiên, khi thời gian vi sóng từ 90-150 s thì hàm lượng giảm xuống còn $21,63 \pm 1,23$ mg/g CK.

Phương pháp kết hợp vi sóng-enzyme (Hình 3) cho thấy hàm lượng saponins ở công suất vi sóng là 270 W tại thời gian 60 s đạt được cao nhất, thay vì ở công suất vi sóng 360W trong thời gian 90 s như khi khảo sát bằng một phương pháp duy nhất. Hiện tượng này có thể bắt nguồn từ thực tế là trong quá trình xử lý bằng một phương pháp duy nhất thì công suất vi sóng 360 W và thời gian 90 s là tối ưu cho việc trích ly saponins. Do đó khi có sự hỗ trợ của enzyme, công suất và thời gian vi sóng sẽ giảm, dẫn đến hiệu quả cao hơn. Khi so sánh với giá trị tối ưu thu được từ từng phương pháp xử lý riêng lẻ, kết quả của thí nghiệm này cho thấy rằng sự kết hợp giữa chiết xuất bằng vi sóng và xử lý bằng enzyme vượt trội hơn quá trình xử lý bằng phương pháp đơn lẻ. Như vậy, kết hợp vi sóng và enzyme cho thấy gia tăng hiệu quả của quá trình chiết xuất saponins.

3.4. Đánh giá hình thái của bột *P. amarus* thu được từ các phương pháp xử lý

Bột *P. amarus* sau khi xử lý bằng vi sóng, enzyme và vi sóng kết hợp enzyme được đem đi chụp SEM để kiểm tra các thay đổi về hình thái, các kết quả thực nghiệm tương ứng được minh họa chi tiết tại Hình 4.



Hình 4. Hình thái của của bột *P. amarus* trước khi xử lý (A) và sau khi xử lý bằng vi sóng (B), enzyme (C) và vi sóng kết hợp enzyme (D)

Đối với mẫu bột *P. amarus* trước khi xử lý (Hình 4-A) thì bề mặt nguyên liệu trơn nhẵn. Còn mẫu bột *P. amarus* sau khi xử lý bằng vi sóng (Hình 4-B) và enzyme (Hình 4-C) thì hình SEM cho thấy bề

mặt nguyên liệu bị co lại và trở nên không đều so với mẫu trước khi bị xử lý. Dẫu có sự khác biệt về cơ chế xâm nhập và phá vỡ cấu trúc nguyên liệu giữa các phương pháp chiết, song kết quả quan sát hình ảnh SEM cho thấy sau khi xử lý bằng vi sóng, sự khác biệt về hàm lượng saponins giữa các mẫu là không đáng kể ($p > 0,05$). Mẫu sau khi kết hợp vi sóng và enzyme (Hình 4-D) cho thấy thành tế bào bị vỡ. Điều này có thể là do độ dày đáng kể của thành tế bào nguyên liệu, nên khi thực hiện các phương pháp như vi sóng hay enzyme riêng lẻ thì sự tác động của chúng lên thành tế bào của nguyên liệu chỉ vừa phải, việc bề mặt vách tế bào không bị biến đổi quá mạnh đã cung cấp bằng chứng thực nghiệm quan trọng, giúp củng cố và làm sáng tỏ các kết luận thu được từ những khảo sát trước đó [26]. Tóm lại, kết hợp vi sóng với enzyme giúp nâng cao hàm lượng saponins hơn so với việc sử dụng từng loại phương pháp riêng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện vận hành tối ưu cho quá trình trích ly saponins từ *P. amarus* thông qua việc tối đa hóa hàm mục tiêu là hàm lượng saponins thu được (mg/g CK). Trong ba phương pháp chiết xuất bằng vi sóng, enzyme và sự kết hợp của chúng, thì sự kết hợp giữa chiết xuất bằng vi sóng với enzyme tạo ra hàm lượng saponins cao nhất. Kết quả nghiên cứu khẳng định việc kết hợp các phương pháp chiết xuất là hướng tiếp cận hiệu quả để thu hồi saponins từ thực vật. Để tối ưu hóa ứng dụng trong thực phẩm và dược phẩm, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào quá trình tinh sạch và định danh cấu trúc chi tiết của các hợp chất này

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự tài trợ và cấp kinh phí bởi Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh theo Hợp đồng số 19/HĐ-DCT ngày 09/01/2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đ. H. Bích *et al.*, Cây Thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, *Khoa học và kỹ thuật*, vol. I, 2006.
- [2] B. Kumar *et al.*, *Phytochemistry of Plants of Genus Phyllanthus*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1201/9781003014867>.
- [3] M. Ali *et al.*, “Selected hepatoprotective herbal medicines: Evidence from ethnomedicinal applications, animal models, and possible mechanism of actions”, *Phytotherapy research* vol. 32, no. 2, pp. 199-215, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.5957>.
- [4] Đ. T. T. Ninh *et al.*, “Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao lỏng từ cây chùm ngây, chó đẻ răng cưa, cà gai leo” *Tạp chí Khoa học Đại học Tân Trào*, vol. 8, no. 2, 2022.
- [5] S.-G. Yeo *et al.*, “Antiviral effects of *Phyllanthus urinaria* containing corilagin against human enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 in vitro”, *Archives of pharmacal research*, vol. 38, pp. 193-202, 2015, doi: <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0390-9>.
- [6] N. N. M. Ngọc *et al.*, “Antibacterial and antifungal activities of the ethanol extract of some medicinal plants”, *Vietnamese Journal of Food Control*, vol. 3, no. 4, pp. 261-269, 2020.
- [7] N. T. T. Huyen *et al.*, “Anti-lipase and MCF-7 breast cancer cell proliferation inhibition *in vitro* the extract-enriched polyphenols and saponins from *Musa balbisiana* fruit”, *HUIT Journal of Science*, vol. 24, no. 1, pp. 93-99, 2024, doi: https://doi.org/10.62985/j.huit_ojs.vol24.no1.24.
- [8] P. Sharma *et al.*, “Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives”, *Food Chemical Toxicology* vol. 150, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112075>.
- [9] N.V. Tạng *et al.*, “Ảnh hưởng của dung môi và phương pháp trích ly đến khả năng chiết tách các hợp chất phenolics, saponins và alkaloids từ vỏ quả ca cao (*Theobroma cacao* L.)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, vol. 56, no. 4, pp. 71-78, 2020, doi: <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.084>.
- [10] P. P. Hiền *et al.*, “Bước đầu ứng dụng công nghệ enzyme để trích ly các hoạt chất thứ cấp từ rễ cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica*)”, *Tạp chí Khoa học và Kinh tế phát triển Đại học Nam Cần Thơ*, no. 05+06, pp. 33-40, 2019.

- [11] H. T. N. Nhon *et al.*, “Ảnh hưởng của sóng siêu âm và vi sóng đến trích ly saponin, polyphenol từ quả chuối hột *Musa balbisiana* và đánh giá hoạt tính kháng enzyme xanthine oxidase của dịch chiết thu được”, *Tạp chí Khoa học Đại học Công Thương* vol. 23, no. 2, pp. 158-168, 2023, doi: https://doi.org/10.62985/j.huit_ojs.vol23.no2.45.
- [12] N. T. Toàn *et al.*, “Ảnh hưởng của điều kiện tách chiết đến hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxi hóa của cây diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) trồng tại Phú Yên”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, vol. 12, pp. 412-421, 2019.
- [13] M. X. Hòa *et al.*, “Nghiên cứu thu nhận saponin từ củ đấng sâm (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf) bằng phương pháp trích ly có hỗ trợ của enzyme và sóng siêu âm”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Trà Vinh*, vol. 40, pp. 83-91, 2020.
- [14] Z. Xiang *et al.*, “Studied on corlorimetric determination of oleanolic acid in Chinese quince”, *Natural Product Research and Development*, vol. 13, no. 4, pp. 23-26, 2001.
- [15] T. B. Schreiner *et al.*, “Evaluation of saponin-rich extracts as natural alternative emulsifiers: A comparative study with pure Quillaja Bark saponin, Colloids and Surfaces A”, *Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 623, 2021.
- [16] B. Deng *et al.*, “Optimization of microwave-assisted extraction saponins from *Sapindus mukorossi* pericarps and an evaluation of their inhibitory activity on xanthine oxidase”, *Journal of Chemistry*, pp. 1-11, 2019, doi: <https://doi.org/10.1155/2019/5204534>.
- [17] S. Akbari *et al.*, “Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool”, *Comptes Rendus Chimie*, vol. 22, no. 11-12, pp. 714-727, 2019.
- [18] N. M. Anh *et al.*, “Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly triterpenoid từ nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) bằng phương pháp enzyme có hỗ trợ siêu âm”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, vol. 22, no. 1, pp. 101-111, 2022.
- [19] T. T. N. Mai “So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu *Sargassum* bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, vol. 62, no. 6, pp. 34-38, 2020.
- [20] Z.-G. Qian “Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 101, pp. 432-434, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.071>.
- [21] W. Wijesinghe *et al.*, “Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review”, *Fitoterapia*, vol. 83, no. 1, pp. 6-12, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.016>.
- [22] P. P. Hiền *et al.*, “Bước đầu ứng dụng công nghệ enzyme để trích ly các hoạt chất thứ cấp từ rễ cây đấng sâm (*Codonopsis javanica*)”, *Tạp chí Khoa học và Kinh tế phát triển Đại học Nam Cần Thơ*, no. 05+06, pp. 33-40, 2019.
- [23] B. B. Li *et al.*, “Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method”, *Separation and purification technology*, vol. 48, no. 2, pp. 189-196, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>.
- [24] N. T. H. Lan *et al.*, “Tối ưu hóa điều kiện trích ly thu nhận Triterpensaponin từ rau đấng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) bằng enzyme cellulase”, *Tạp chí Khoa học Đại học Văn Hiến*, vol. 6, no. 3, pp. 120-131, 2019.
- [25] I. Drevelegka *et al.*, “Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes”, *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, vol. 149, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>.
- [26] T. T. N. Thư *et al.*, “Ảnh hưởng thời gian và mức năng lượng siêu âm đến hiệu quả chiết isoflavone từ hạt đậu nành”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng* vol. 11, no. 132, pp. 157-161, 2018.

ABSTRACT

EXTRACTING SAPONINS FROM *Phyllanthus amarus* WITH MICROWAVE AND ENZYME ASSISTED EXTRACTION

Nguyen Thi Hai Hoa, Tran Thi Thu Phuong, Tran Thi Bich Tram,
Hoang Thi Ngoc Nhon*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: nhonhtn@huit.edu.vn

Natural herbal sources have long been recognized as vast reservoirs of bioactive compounds with diverse biological activities. Among these, saponins have emerged as a prominent subclass, garnering significant attention in modern medicine for their positive physiological effects. Given its proven pharmacological values, *Phyllanthus amarus* has been widely utilized in traditional medicine with immense therapeutic potential. To maximize these biological benefits, the present study evaluates the impact of various pretreatment methods-including microwave, enzyme, and a microwave-enzyme combination-on the extraction efficiency of saponins from *P. amarus*. Using microwave-assisted extraction (MAE), a saponin yield of 29.08 ± 0.79 mg/g CK was achieved at 360 W for 90 s. In contrast, enzyme-assisted extraction (EAE) yielded 23.42 ± 1.09 mg/g CK under the optimal conditions of 0.8% (v/w) enzyme concentration, pH 5.5, and 90 min incubation period. And for the microwave-assisted enzymatic extraction, the saponins content obtained was 34.75 ± 1.05 mg/g CK under the condition of power 270 W for 60 s.

Keywords: *Phyllanthus amarus*, saponins, microwave, Viscozyme L.