

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT SAPONIN TRITERPENOID TỪ BÃ HẠT CÂY SỜ (*Camellia oleifera*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT (RSM)

Đỗ Thị Mai Trinh^{1*}, Trương Minh Ngọc¹,
Nguyễn Thị Liên¹, Nguyễn Thị Hạnh²

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ TP.HCM

²Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: dothimaitrinh24@gmail.com

Ngày nhận bài: 13/5/2022; Ngày chấp nhận đăng: 18/7/2022

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất saponin triterpenoid từ bã hạt cây Sờ (*Camellia oleifera*) bằng dung môi ethanol. Sự ảnh hưởng của các yếu tố bao gồm: nồng độ dung môi (ethanol), tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w) và thời gian tách chiết lần lượt được khảo sát. Hàm lượng saponin triterpenoid được xác định bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis sau khi chiết mẫu và làm phản ứng tạo màu Rosenthaler của saponin với thuốc thử acid perchloric và vanillin. Thực hiện tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất theo phương pháp đáp ứng bề mặt Response Surface Method (RSM) kết hợp với mô hình tâm phức hợp (CCD). Bã hạt cây Sờ được thu mua từ cơ sở ép dầu Quang Thanh, tỉnh Nghệ An, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ 105 °C trong 5 giờ được dùng cho các thí nghiệm. Kết quả tối ưu theo mô hình CCD cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid đạt cực đại 5,451% tại tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 19:1 (v/w), nồng độ EtOH 80% và thời gian 77 giờ. Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.

Từ khóa: *Camellia oleifera*, hàm lượng saponin triterpenoid, mô hình bề mặt đáp ứng.

1. MỞ ĐẦU

Cây Sờ (*Camellia oleifera*) là loài cây thuộc họ trà được trồng chủ yếu tại Trung Quốc, Việt Nam. Từ hạt cây Sờ qua ép người ta thu được dầu, loại dầu này được sử dụng chủ yếu dùng sản xuất dầu thực phẩm. Bã khô sau ép một phần người dân dùng làm chất xử lý hồ ao do có tác dụng diệt cá tạp, ốc bươu vàng trong ruộng lúa, tuyến trùng và sâu hại trong đất [1], còn lại hầu như là bỏ đi, không được chú ý đến. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng bã hạt cây Sờ khô sau khi ép có chứa một lượng khá dồi dào hợp chất có tên khoa học là saponin [2]. Hạt cây Sờ có chứa nhiều các hợp chất thuộc nhóm saponin như triterpenoid có tác dụng kháng nấm, kháng khuẩn, tiêu diệt côn trùng [3, 4]. Saponin triterpenoid là một nhóm các saponin có phần aglycol là các triterpenoid. Các saponin triterpenoid có đầy đủ tính chất đặc trưng của saponin như khả năng tạo bọt, khả năng tan trong nước, methanol, ethanol loãng. Ngoài ra, khi tác dụng với acid vô cơ mạnh (perchloric acid, sulfuric acid) và thuốc thử vanillin, hơi nóng sẽ cho màu tím hoa cà. Đây là phản ứng để phân biệt saponin triterpenoid với saponin steroid [5].

Công nghệ chiết xuất chú trọng đến các yếu tố như hiệu suất chiết, điều kiện chiết hay quy trình (an toàn và kinh tế), khả năng triển khai ở quy mô sản xuất. Để nâng cao hiệu quả của dịch chiết, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất thường được tối ưu hóa. Thông thường, các nghiên cứu dùng phương pháp cổ điển là luân phiên từng biến để thay đổi các thông số khảo sát trong quá trình tối ưu hóa. Tuy nhiên, phương pháp này không thể hiện rõ

ràng sự tương tác hay ảnh hưởng giữa các biến với nhau và tổng số thí nghiệm thực hiện tăng lên nhiều khi số lượng biến khảo sát tăng. Do đó, hiện nay trong nghiên cứu, thường sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) để tối ưu hóa các thông số trong quá trình chiết. Phương pháp này được phát triển dựa trên các kỹ thuật toán học và thống kê, dựa trên sự phù hợp và liên quan giữa kết quả thu được từ mô hình thực nghiệm và thiết kế thí nghiệm [6, 7]. Phương pháp RSM đã được ứng dụng trong tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hoạt chất tự nhiên, tổng hợp hóa học hay tối ưu hóa các quá trình hóa học khác [8].

Phương pháp tối ưu hóa đã được thực hiện nhiều trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Yongjun Liu *et al.* (2016) đã tối ưu hóa quy trình chiết xuất saponin từ bánh dầu *Camellia oleifera* Abel bằng phương pháp kết hợp giữa dung dịch kiềm và cô lập [9]. Sweeta Akbari *et al.*, (2019) đã tối ưu hóa saponin, phenol và chất chống oxy hóa chiết xuất từ hạt cò cà ri bằng cách sử dụng phương pháp xử lý đáp ứng bề mặt và phản ứng có sự hỗ trợ của vi sóng như một công cụ tối ưu hóa [10]. Yupiao Hu *et al.* (2018) đã nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất hồi lưu ethanol để chiết xuất saponin từ *Panax notoginseng* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt và đánh giá tác dụng tạo máu [11]. Sen He *et al.* (2022) đã tối ưu hóa công nghệ chiết xuất saponin steroid có hỗ trợ siêu âm từ *Polygonatum kingianum* Collett & Hemsl và đánh giá chất lượng được trồng ở các khu vực khác nhau [12]. Ở Việt Nam, Nguyễn Thị Hương Lan và cs (2018) đã tối ưu hóa điều kiện trích ly thu nhận triterpensaponin từ rau đắng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) bằng enzyme cellulase [13].

Trên cơ sở đó, trong nghiên cứu này các thông số công nghệ như: nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, thời gian chiết xuất saponin triterpenoid được tiến hành đánh giá mức độ tác động bằng mô hình Plackett Burman và tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Response Surface Methodology (RSM) để tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất thu nhận saponin triterpenoid.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Bã hạt cây Sờ được thu mua tại cơ sở ép dầu Quang Thanh, tỉnh Nghệ An. Bột thô của bã hạt Sờ sau khi đã ép dầu được đem về sấy khô ở nhiệt độ 105 °C trong 5 giờ, sau đó được sàng qua rây có kích thước lỗ 2 mm lấy phần bột mịn. Bột bã hạt Sờ được đựng trong chai thủy tinh tối màu và bảo quản ở nhiệt độ phòng 25 ± 2 °C.

Acid oleanolic (99,9% - Merck), thuốc thử vanillin (99,9% - Merck), perchloric acid (99,9% - Ấn Độ), ethyl acetate (99,9% - Merck), ethanol (≥99,8%; tỷ trọng: 0,79 g/cm³ (20 °C) - Merck).

Dung dịch chuẩn: cân chính xác 5 mg chất chuẩn acid oleanolic pha trong ethanol tuyệt đối vừa đủ 50 mL thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1 mg/mL.

Thuốc thử vanillin trong ethanol tuyệt đối 50 mg/mL (5%): cân 0,5 g vanillin tinh thể pha trong ethanol tuyệt đối vừa đủ 10 mL thu được thuốc thử có nồng độ 50 mg/mL.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện trích ly đến hàm lượng saponin triterpenoid

2.2.1.1. Khảo sát tỷ lệ dung môi: nguyên liệu đến hàm lượng saponin triterpenoid

Cân chính xác 5,0 g bột bã hạt cây Sờ được sàng qua rây có kích thước lỗ 2 mm cho vào bình erlen 50 mL. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu ở các giá trị 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 (v/w); nồng độ ethanol cố định 70%, thời gian ngâm chiết trong 48 giờ.

Bình erlen được đặt trên máy lắc và duy trì ở nhiệt độ phòng. Sau khi kết thúc quá trình ngâm, dịch chiết được đem đi trích ly và lọc qua giấy lọc Newstar có kích thước $\phi 110$ mm để thu lấy phần dịch trong. Kết hợp phản ứng với phân tích quang phổ UV-Vis ở bước sóng 550 nm để xác định hàm lượng saponin triterpenoid có trong dịch chiết bã hạt cây Sờ.

2.2.1.2. Khảo sát nồng độ dung môi ethanol (%) đến hàm lượng saponin triterpenoid

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như mô tả ở mục 2.2.1.1.

Tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là kết quả ở thí nghiệm 2.2.1.1; thời gian ngâm chiết trong 48 giờ. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi ở các giá trị ethanol: 40%; 50%; 60%; 70%; 80%; 90; 99,8%.

2.2.1.3. Khảo sát thời gian (giờ) đến hàm lượng saponin triterpenoid

Thí nghiệm được thực hiện tương tự như mô tả ở mục 2.2.1.1.

Tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là kết quả thí nghiệm 2.2.1.1; nồng độ ethanol ngâm chiết là kết quả thí nghiệm 2.2.1.2. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết ở các giá trị: 48, 72, 96, 120, 144 giờ.

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện trích ly thu nhận saponin triterpenoid từ bã hạt cây Sờ

Quá trình tối ưu hóa theo mô hình đáp ứng bề mặt được sử dụng để nghiên cứu saponin triterpenoid từ bã hạt cây Sờ với ba yếu tố là tỷ lệ dung môi: nguyên liệu (X1), nồng độ ethanol (X2) và thời gian ngâm chiết (X3). Mỗi yếu tố được chia làm 3 mức thay đổi, cụ thể theo Bảng 1.

Bảng 1. Mã hóa các yếu tố khảo sát

Yếu tố	Các giá trị được mã hóa		
	-1	0	1
Tỷ lệ DM:NL (v/w)	10:1	15:1	20:1
Nồng độ EtOH (%)	70	80	90
Thời gian ngâm chiết (giờ)	72	96	120

2.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

2.3.1. Phương pháp phân tích xác định hàm lượng saponin triterpenoid

Xây dựng đường chuẩn của acid oleanolic: Dung dịch acid oleanolic pha với nồng độ 0,1 mg/mL, được cho vào các ống nghiệm với các thể tích khác nhau với 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL. Sau đó, dung môi được đun nóng đến bay hơi trong nồi cách thủy 80°; hỗn hợp mới 0,2 mL dung dịch vanilin 5% (w/v) và 1,2 mL perchloric acid được thêm vào, trộn đều và ủ ở 70 °C trong 15 phút, các ống nghiệm được đưa ra ngoài và làm lạnh trong nước chảy để 2 phút. Tiếp theo bổ sung thêm etyl acetate vào để tạo ra tổng thể tích là 5 mL. Sau khi được làm lạnh đến nhiệt độ phòng, với dung dịch trắng làm đối chiếu, đo độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm [14].

Xác định hàm lượng saponin triterpenoid trong mẫu: Để xác định độ lặp lại của phương pháp, tiến hành với các thí nghiệm riêng biệt, với cùng điều kiện chiết (mẫu M0). Dịch chiết sau khi trích ly được lọc và pha loãng 20 lần. Hút chính xác 0,2 mL dịch trích sau ly tâm cho vào ống nghiệm, tiến hành các thao tác như trên. Hàm lượng saponin triterpenoid được phân tích dựa trên phương pháp quang phổ so màu, đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 550 nm. Hàm lượng saponin triterpenoid % (mg/g chất khô) được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng saponin triterpenoid \%} = \frac{C \times n \times V}{V_1 \times m \times (100-h)} \times 100 (\%)$$

Trong đó: C là nồng độ saponin triterpenoid (mg/mL); m là khối lượng mẫu (g); h là độ ẩm nguyên liệu (%); V là tổng thể tích dịch chiết (mL), V_1 là thể tích phân tích của dịch chiết (mL), n là hệ số pha loãng.

2.3.2. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng trung bình \pm giá trị độ lệch phương sai (mean \pm SD). Sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XVII phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và phân tích phương sai ANOVA ($p < 0,05$) đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Thiết kế thí nghiệm và xử lý kết quả đáp ứng bề mặt theo mô hình RSM - CCD bằng phần mềm Minitab 18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu đến hàm lượng saponin triterpenoid thu được từ bã hạt cây Sô

Kết quả xây dựng phương trình đường chuẩn acid oleanolic: $y = 0,0651x - 0,0611$; $R^2 = 0,9931$. Trong đó: x là nồng độ của saponin triterpenoid - mg/mL; y là độ hấp thụ đo ở bước sóng 550 nm.

Sau khi đánh giá hàm lượng ẩm đạt 2,36% và thu dịch chiết từ bã hạt cây Sô, tiến hành phân tích hàm lượng saponin triterpenoid bằng phương pháp đo quang phổ. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid tăng dần khi tăng lượng dung môi và hàm lượng saponin triterpenoid và thu được nhiều nhất là 5,052% ở tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 15:1(v/w), khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được không tăng lên mà có xu hướng tiệm cận ngang. Điều đó có nghĩa là do khi lượng dung môi quá ít (ở tỷ lệ 5:1) không đủ để hòa tan, trích ly hết lượng saponin triterpenoid ra khỏi tế bào. Do đó, khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì hàm lượng saponin triterpenoid thu được có sự tăng mạnh. Tuy nhiên, khi trích ly với lượng dung môi quá nhiều, trong khi hàm lượng saponin triterpenoid của nguyên liệu là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha, làm hiệu quả chiết xuất saponin triterpenoid không tăng. Việc sử dụng lượng lớn dung môi mà không đem lại hiệu quả khai thác chất hòa tan sẽ gây lãng phí dung môi, khó khăn cho các bước công nghệ tiếp theo như tinh sạch sản phẩm [11]. Kết quả này là tương đồng với nghiên cứu của Wanying Gong *et al.*, (2017) khi chiết xuất saponin từ hạt *Camellia sinensis* var [15]. Do đó, tỷ lệ DM: NL 15:1 được chọn làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi: nguyên liệu đến quá trình trích ly saponin triterpenoid

Tỷ lệ dung môi: nguyên liệu (v/w)	Hàm lượng saponin triterpenoid (%)
5:1	2,416 ^a \pm 0,046
10:1	3,433 ^b \pm 0,04
15:1	5,052 ^c \pm 0,032
20:1	4,943 ^c \pm 0,065
25:1	4,961 ^c \pm 0,099

(^{a,b,c}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng saponin triterpenoid thu được từ bã hạt cây Sờ

Hiệu quả trích ly saponin triterpenoid từ nguyên liệu thực vật phụ thuộc vào loại dung môi sử dụng, đặc biệt là độ phân cực của dung môi. Với mục tiêu là tối ưu khả năng thu nhận saponin triterpenoid cũng như lựa chọn dung môi an toàn cho việc ứng dụng sau này, ethanol là dung môi được chọn để tiến hành trích ly. Tuy nhiên, nồng độ ethanol khác nhau thì mức độ hòa tan các hợp chất sẽ khác nhau. Vì vậy, ở thí nghiệm này khảo sát nồng độ dung môi ethanol lên khả năng thu nhận saponin triterpenoid, các nồng độ được lựa chọn trong khoảng từ 40% - 100%. Quá trình trích ly được thực hiện với tỷ lệ DM: NL là 15:1, thời gian 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Nồng độ dung môi được thay đổi từ 40; 50; 60; 70; 80; 90; 99,8% [10]. Hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng saponin triterpenoid

Nồng độ EtOH (%)	Hàm lượng saponin triterpenoid (%)
40	3,850 ^a ± 0,05
50	4,042 ^b ± 0,06
60	4,534 ^c ± 0,048
70	4,923 ^d ± 0,041
80	5,068 ^e ± 0,033
90	5,116 ^e ± 0,057
99,8	4,604 ^e ± 0,094

(^{a,b,c}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

Theo kết quả ở Bảng 3, nồng độ ethanol càng cao, hàm lượng saponin triterpenoid càng tăng và sẽ không tăng khi dung dịch trích ly đạt sự cân bằng. Hàm lượng saponin triterpenoid tăng từ 3,85% ở nồng độ EtOH 40% đến 5,116% ở nồng độ EtOH 90% và bắt đầu giảm xuống ở nồng độ EtOH 99,8% (4,604%). Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến năng suất chiết xuất cho thấy rằng, việc bổ sung một lượng nhỏ nước vào dung môi chiết xuất thường giúp tăng năng suất chiết xuất của các hợp chất mục tiêu từ các mẫu [16]. Nồng độ ethanol càng cao, khả năng bay hơi càng nhanh, lượng dung môi giảm, khả năng thẩm thấu của dung môi vào các cấu tử giảm, đây cũng là nguyên nhân dẫn đến hiệu suất trích ly các dung dịch ethanol có nồng độ cao thấp hơn giá trị tối ưu [12]. Hàm lượng saponin triterpenoid đạt tối đa tại nồng độ EtOH 90% với 5,116% và không có sự khác biệt về ý nghĩa so với nồng độ EtOH 80% (5,068%). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Xiang Zou *et al.*, (2017) khi chiết xuất saponin tổng số từ *Ornithogalum Caudatum* Ait [17]. Do đó, nồng độ EtOH 80% được chọn làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin triterpenoid thu được từ bã dầu sờ

Thời gian cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hàm lượng saponin triterpenoid. Nếu thời gian chiết kéo dài không những ảnh hưởng hàm lượng saponin triterpenoid giảm mà còn làm tăng lượng tạp chất trong quá trình chiết. Nhưng nếu thời gian chiết ngắn thì không đủ cho hàm lượng saponin triterpenoid hòa tan hết gây tổn thất lớn [9]. Do vậy, cần xác định thời gian chiết tối ưu. Thí nghiệm với các mốc thời gian chiết lần lượt là 48, 72, 96, 120 và 144 giờ. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin triterpenoid

Thời gian trích ly (giờ)	Hàm lượng saponin triterpenoid (%)
48	5,955 ^{bc} ± 0,086
72	6,135 ^c ± 0,093
96	6,377 ^d ± 0,126
120	5,835 ^{ab} ± 0,09
144	5,671 ^a ± 0,099

(^{a,b,c}: Các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$)

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid tăng dần từ 48 đến 96 giờ (từ 5,955% đến 6,377%) và hàm lượng saponin triterpenoid đạt cao nhất là (6,377%) ở thời gian 96 giờ. Khi tiếp tục tăng thời gian từ 120 giờ đến 144 giờ thì hàm lượng saponin triterpenoid giảm dần (lần lượt là 5,835% và 5,671%). Điều đó cho thấy, 96 giờ là khoảng thời gian thích hợp để dung môi và nguyên liệu tiếp xúc và hòa tan với nhau. Khi tăng thời gian chiết, các cấu tử không còn để hòa tan vào dung môi nữa, thay vào đó, sự bay hơi của dung môi có thể làm thất thoát một phần cấu tử cần hòa tan [12]. Vì vậy, thời gian ngâm chiết được lựa chọn làm thông số cố định cho các thí nghiệm tiếp theo là 96 giờ.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện trích ly saponin triterpenoid

Từ kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của từng đơn yếu tố, sau khi chọn được các giá trị tối ưu của từng đơn yếu tố, tiến hành tối ưu hóa quá trình trích ly bằng phương pháp RSM với 3 yếu tố là tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nồng độ EtOH và thời gian trích ly. Dựa trên hàm lượng saponin triterpenoid thu được từ thực nghiệm theo mô hình CCD, tiến hành phân tích kết quả để chọn ra nồng độ tối ưu của các yếu tố tác động đến sự trích ly saponin triterpenoid. Kết quả thực nghiệm và giá trị dự đoán từ mô hình CCD của các nghiệm thức được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman, số liệu thực nghiệm và giá trị dự đoán theo mô hình

Tỷ lệ DM: NL (v/w)	Nồng độ EtOH (%)	Thời gian trích ly (giờ)	Hàm lượng saponin triterpenoid (%)	
			Thực nghiệm	Dự đoán
X ₁	X ₂	X ₃		
15:1	80	55	5,350	5,366
10:1	70	72	4,435	4,460
20:1	70	72	3,281	3,322
10:1	90	72	5,046	5,014
20:1	90	72	5,028	5,014
15:1	63	96	5,032	5,014
15:1	97	96	4,965	5,014
6:1	80	96	5,035	5,014
15:1	80	96	4,986	5,014
15:1	80	96	5,369	5,364
15:1	80	96	4,447	4,458
15:1	80	96	3,573	3,531
15:1	80	96	4,940	4,921
15:1	80	96	3,461	3,429

Tỷ lệ DM: NL (v/w)	Nồng độ EtOH (%)	Thời gian trích ly (giờ)	Hàm lượng saponin triterpenoid (%)	
X ₁	X ₂	X ₃	Thực nghiệm	Dự đoán
23:1	80	96	4,782	4,765
10:1	70	120	4,132	4,185
20:1	70	120	5,350	5,366
10:1	90	120	4,435	4,460
20:1	90	120	3,281	3,322
15:1	80	136	5,046	5,014

Hàm lượng saponin triterpenoid trích ly được trong khoảng 3,32-5,36%, trong đó thấp nhất ở nghiệm thức thứ 3 và 18 (3,281%) và cao nhất ở nghiệm thức thứ 10 (5,369 %).

$$\text{Phương trình hồi quy } Y = 5,214 + 0,5555 X_1 - 0,0006 X_2 - 0,2963 X_3 - 0,3526 X_1^2 - 0,2585 X_2^2 - 0,1708 X_3^2 - 0,0135 X_1 X_2 + 0,0995 X_1 X_3 - 0,0640 X_2 X_3 \quad (1)$$

Trong đó: Y là hàm lượng saponin triterpenoid (%); X₁: tỷ lệ DM: NL (v/w); X₂: nồng độ EtOH (%); X₃: thời gian trích ly (giờ). Hệ số hồi quy (R²) tính được là 0,9952, điều này thể hiện rằng có 99,52% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Giá trị R² lớn hơn 0,8 thể hiện mô hình tương thích với thực nghiệm có nghĩa là có sự tương quan rất chặt chẽ giữa các yếu tố thí nghiệm và hàm lượng saponin triterpenoid [18].

Bảng 6. Phân tích phương sai cho mô hình thực nghiệm

Nguồn	Hệ số tự do	Tổng bình Phương	Trung bình bình phương	F-Value	P-Value
Mô hình	9	8,24110	0,91568	230,57	0,000
Tuyến tính	3	5,41349	1,80450	454,39	0,000
X ₁	1	4,21424	4,21424	1061,18	0,000
X ₂	1	0,00000	0,00000	0,00	0,975
X ₃	1	1,19925	1,19925	301,98	0,000
Bình phương	3	2,71427	0,90476	227,83	0,000
X ₁ *X ₁	1	1,79127	1,79127	451,06	0,000
X ₂ *X ₂	1	0,96297	0,96297	242,48	0,000
X ₃ *X ₃	1	0,42027	0,42027	105,83	0,000
Tương tác 2 chiều	3	0,11333	0,03778	9,51	0,003
X ₁ *X ₂	1	0,00145	0,00145	0,36	0,559
X ₁ *X ₃	1	0,07914	0,07914	19,93	0,001
X ₂ *X ₃	1	0,03274	0,03274	8,24	0,017
Sai số	10	0,03971	0,00397		
Sai số của mô hình	5	0,03456	0,00691	6,71	0,028
Sai số ngẫu nhiên	5	0,00515	0,00103		
Tổng số	19	8,28081			

Ghi chú: X₁: tỷ lệ DM: NL (v/w); X₂: nồng độ EtOH (%); X₃: thời gian trích ly (giờ)

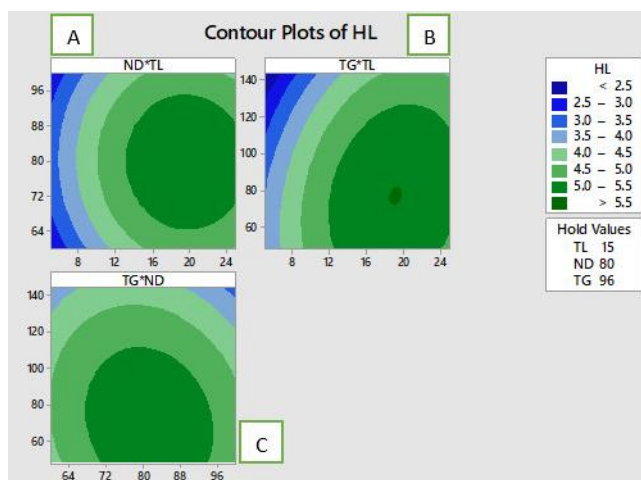
Dựa trên kết quả phân tích ANOVA ở Bảng 6, các tham số hồi quy bậc 1 và bậc 2 đều có P-value = 0,000, cho thấy phương trình hồi quy có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Kết quả phân tích cho thấy rằng, hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận được bị ảnh hưởng bởi các yếu tố bậc 1 là tỷ lệ DM: NL (X_1) và thời gian ngâm chiết (X_3), chịu ảnh hưởng của các yếu tố bậc 2 bao gồm tỷ lệ DM: NL ($X_1 * X_1$), nồng độ EtOH ($X_2 * X_2$) và thời gian ngâm chiết ($X_3 * X_3$), đồng thời còn bị ảnh hưởng bởi hai cặp nhân tố bao gồm tỷ lệ DM: NL – thời gian ngâm chiết ($X_1 * X_3$) và nồng độ EtOH – thời gian ngâm chiết ($X_2 * X_3$). P-value của tham số X_2 (nồng độ) và $X_1 * X_2$ cao hơn 0,05 (không có ý nghĩa thống kê) nên các tham số này ảnh hưởng không đáng kể đến mô hình thực nghiệm và có thể loại bỏ chúng khỏi phương trình hồi quy.

Bảng 7. Ý nghĩa thống kê của các hệ số trong mô hình thực nghiệm

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
a0	5,2137	0,0257	202,85	0,000	
X1	0,5555	0,0171	32,58	0,000	1,00
X2	-0,0006	0,0171	-0,03	0,975	1,00
X3	-0,2963	0,0171	-17,38	0,000	1,00
X1*X1	-0,3526	0,0166	-21,24	0,000	1,02
X2*X2	-0,2585	0,0166	-15,57	0,000	1,02
X3*X3	-0,1708	0,0166	-10,29	0,000	1,02
X1*X2	-0,0135	0,0223	-0,60	0,559	1,00
X1*X3	0,0995	0,0223	4,46	0,001	1,00
X2*X3	-0,0640	0,0223	-2,87	0,017	1,00

Phương trình hồi quy mới là: $Y = 5,214 + 0,5555 X_1 - 0,2963 X_3 - 0,3526 X_1^2 - 0,2585 X_2^2 - 0,1708 X_3^2 + 0,0995 X_1 X_3 - 0,0640 X_2 X_3$

Trong đó: Y là hàm lượng saponin triterpenoid (%); X_1 : tỷ lệ DM: NL (v/w); X_2 : nồng độ EtOH (%); X_3 : thời gian trích ly (giờ). Tương quan giữa các yếu tố trong phương trình hồi quy được biểu diễn ở Hình 1.



Hình 1. Tương quan giữa các yếu tố trong phương trình hồi quy
 A. Tương tác giữa tỷ lệ DM:NL và nồng độ EtOH; B. Tương tác giữa tỷ lệ DM:NL và thời gian ngâm chiết; C. Tương tác giữa nồng độ EtOH và thời gian ngâm chiết.

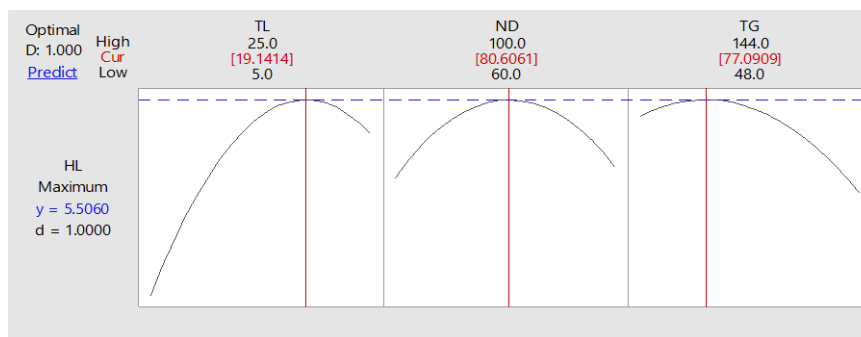
Đồ thị đồng mức (contour plot) được trình bày tại Hình 1. Kết quả cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid tăng dần từ màu xanh da trời đến màu xanh lá cây. Rõ ràng 3 đồ thị đều xuất hiện giá trị cực đại của hàm mục tiêu. Điều này cho thấy khoảng khảo sát của 3 yếu tố đã chọn là phù hợp.

Hình 1A mô tả sự ảnh hưởng của tỷ lệ DM: NL và nồng độ EtOH đến hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận. Ở bất kỳ nồng độ EtOH nào, khi tăng tỷ lệ DM: NL từ 5: 1 đến 15: 1 sẽ làm tăng hàm lượng saponin triterpenoid rõ rệt do tỷ lệ DM: NL càng cao tức nồng độ chất cần trích ly trên bề mặt pha rắn càng thấp. Do đó, chênh lệch gradient nồng độ giữa bên trong và bề mặt vật liệu rắn càng cao và làm tăng sự khuếch tán của chất tan từ vật liệu ra môi trường hay làm tăng hiệu suất trích ly [10]. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ DM: NL từ 15: 1 đến 20: 1, ở nồng độ EtOH 70-90% hàm lượng saponin triterpenoid đạt trạng thái bão hòa. Ở nồng độ 60 và 100% thì hàm lượng saponin triterpenoid có xu hướng giảm. Nhưng khi đánh giá sự tương tác của tỷ lệ DM: NL và nồng độ EtOH thì không có ý nghĩa về mặt thống kê giữa hai yếu tố này (Bảng 7).

Hình 1B mô tả sự ảnh hưởng của tỷ lệ DM: NL và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận. Tại tỷ lệ DM: NL nhất định, khi tăng thời gian ngâm chiết từ 48-144 giờ thì hàm lượng saponin triterpenoid có xu hướng giảm do quá trình oxy hóa xảy ra trong dịch chiết khi thời gian trích ly quá lâu [12].

Hình 1C mô tả sự ảnh hưởng của nồng độ EtOH và thời gian ngâm chiết đến hàm lượng saponin triterpenoid thu nhận. Tại mốc thời gian xác định (48-96 giờ), khi tăng nồng độ dung môi chiết từ 60-90% thì hàm lượng saponin triterpenoid tăng và giảm ở nồng độ ethanol từ 90-100%. Từ 96-144 giờ hàm lượng saponin triterpenoid thu được thấp hơn và không có sự thay đổi rõ rệt khi tăng nồng độ EtOH.

Thiết kế thí nghiệm bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) nhằm mục đích tìm ra các điều kiện tối ưu của từng yếu tố để cải thiện quy trình trích ly saponin triterpenoid từ bột bã hạt cây Sò. Từ kết quả thực nghiệm thu được, tiến hành chạy Minitab 18 để được các giá trị mã hóa tối ưu của từng yếu tố trong thí nghiệm.



Hình 2. Đồ thị biểu diễn các điểm tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly saponin triterpenoid từ bã hạt cây Sò

Từ các giá trị mã hóa thu được tiến hành thí nghiệm trích ly saponin triterpenoid trên cùng điều kiện với các nồng độ tối ưu đã được dự đoán. Kết quả thực nghiệm thu được sẽ so sánh với giá trị dự đoán từ mô hình nhằm kiểm chứng giá trị dự đoán.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra thực nghiệm các thông số tối ưu từ phương trình hồi quy

Giá trị tối ưu			Hàm lượng saponin triterpenoid (%)	
Tỷ lệ DM: NL (v/w)	Nồng độ EtOH (%)	Thời gian (giờ)	Thực nghiệm	Dự đoán
19,14: 1	80,6	77,09	5,451 ± 0,09	5,506

Kết quả tối ưu theo mô hình CCD cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid đạt cực đại 5,506 tại tỷ lệ DM: NL 19: 1 (v/w), nồng độ EtOH 80% và thời gian 77 giờ. Tiến hành kiểm tra thực nghiệm, kết quả thu được ở Bảng 8 cho thấy hàm lượng saponin triterpenoid đạt 5,451%, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán từ phương trình hồi quy. Như vậy, kết quả tối ưu hóa phù hợp với thực nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng các điều kiện của quá trình trích ly saponin triterpenoid từ bột bã hạt Sô với tỷ lệ dung môi: nguyên liệu, nồng độ ethanol và thời gian có ảnh hưởng tích cực đến hiệu quả chiết xuất. Hàm lượng saponin triterpenoid thu được cao nhất đạt 5,451% khi tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 19:1 (v/w); nồng độ ethanol 80% và thời gian trích ly 77 giờ.

Công cụ thiết kế thí nghiệm tối ưu đa yếu tố của Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm (RSM-CCD) theo đánh giá là những công cụ mạnh trong việc sàng lọc và tối ưu hóa giá trị các yếu tố làm cho hàm đáp ứng cực đại. Việc sử dụng các công cụ này cùng với phần mềm chuyên dụng Minitab giảm được thời gian tiêu tốn, giảm các thí nghiệm đồng thời có thể lựa chọn một trong những giải pháp tối ưu do phần mềm đề nghị.

Lời cảm ơn: Để thực hiện và hoàn thành bài báo khoa học này, tôi xin chân thành cảm ơn Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh - đơn vị chủ trì thực hiện đề tài nhiệm vụ KH&CN cấp Bộ “Nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học từ cây sô, cây dầu giun và cây nghệ rễ để phòng trừ một số côn trùng gây hại trên cây chanh dây” do KS. Nguyễn Thị Liên làm chủ nhiệm đã hỗ trợ kinh phí thực hiện các nội dung nghiên cứu của bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Trường Thành - Sản xuất thử nghiệm trên diện rộng chế phẩm thảo mộc trừ ốc bươu vàng hại lúa, Hà Nội (2007)
2. Sarmah K., Das P., Saikia G.K., and Sarmah T.C. - Biochemical characterization of tea (*Camellia* spp) seed oil cake, Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences **7** (9) (2018) 45-49.
3. Jiang X., Hansen H.C.B., Strobel B.W. and Cedergreen N. - What is the aquatic toxicity of saponin-rich plant extracts used as biopesticides?, Environmental Pollution **236** (2018) 416-424.
4. Kijprayoon S., Tolieng V., Petsom A. and Chaicharoenpong C. - Molluscicidal activity of *Camellia oleifera* seed meal, ScienceAsia **40** (2014) 393-399.
5. Ngô Văn Thu - Hóa học saponin, Trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh (1990).
6. Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A. - Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, Talanta **76** (5) (2008) 965-977.
7. Khuri A.I., Mukhopadhyay S. - Response surface methodology, Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics **2** (2) (2010) 128-149.
8. Long H., Cai X., Yang H., He J., Wu J., Lin R. - Optimization of monomethoxy polyethyleneglycol-modified oxalate decarboxylase by response surface methodology, Journal of Biological Physics **43** (3) (2017) 445-459.

9. Liu Y., Li Z., Xu H., Han, Y. - Extraction of saponin from *Camellia oleifera* abel cake by a combination method of alkali solution and acid isolation, *Journal of Chemistry* (2016) 6903524.
10. Akbari S., Abdurahman N.H., Yunus R.M. - 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* **22** (11-12) (2019) 714-727.
11. Hu Y., Cui X., Zhang Z., Chen L., Zhang Y., Wang C., Yang X., Qu Y., Xiong Y. - Optimisation of ethanol-reflux extraction of saponins from steamed *Panax notoginseng* by response surface methodology and evaluation of hematopoiesis Effect, *Molecules* **23** (5) (2018) 1206.
12. He S., Wang X., Chen J., Li X., Gu W., Zhang F., Cao G. and Yu J. - Optimization of the ultrasonic-assisted extraction technology of steroidal saponins from *Polygonatum kingianum* Collett & Hemsl and evaluating its quality planted in different areas, *Molecules* **27** (5) (2022) 1463.
13. Nguyễn Thị Hương Lan, Phùng Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Thị Thu Thảo, Trương Trọng Nguyên, Hoàng Thị Trúc Quỳnh - Tối ưu hóa điều kiện trích ly thu nhận triterpensaponin từ rau đắng biển (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst) bằng enzyme cellulase, *Tạp chí khoa học Đại học Văn Hiến* **6** (3) (2019) 120-131.
14. Chen Y., Xie M.Y., Gong X.F. - Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*, *Food Engineering* **81** (1) (2007) 162-170.
15. Gong W., Huang Y., Ji A., Peng W., Liu C., Zeng Y., Yang R., Yan L., Wang X., Sheng J. - Optimisation of saponin extraction conditions with *Camellia sinensis* var. *assamica* seed and its application for a natural detergent, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98** (6) (2018) 2312-2319.
16. Ren Y., Chen Y., Hu B., Wu H., Lai F., Li X. - Microwave-assisted extraction and a new determination method for total steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright, *Steroids* **104** (2015) 145-152.
17. Zou X., Qu Z.Y., Lin L., Wang Y.M., Ji Y.B. - Optimizing the extraction of total saponins from *Ornithogalum Caudatum* Ait. by response surface methodology, *BTAIJ* **7** (11) (2013) 488-492.
18. Gabrielsson J., Lindberg N.O., Lundstedt T. - Multivariate methods in pharmaceutical applications, *Journal of the Chemometrics Society* **16** (3) (2002) 141-160.
19. Abbott W.S. - Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, *Journal of Economic Entomology* **18** (2) (1925) 265-267.
20. Hu J.L., Nie S.P., Huang D.F., Li C., Xie, M.Y. - Extraction of saponin from *Camellia oleifera* cake and evaluation of its antioxidant activity, *Food Science and Technology* **47** (8) (2012) 1676-1687.
21. Xiansheng L. - Study on the development and utilization of Oil-tea *Camellia*, *Hunan Univ. of Sci. Engg* **26** (2005) 127-129.
22. Borges P.R.S., Tavares E.G., Guimarães I.C., de Paulo Rocha R., Araujo A.B.S., Nunes E.E., Boas E.V.D.B.V. - Obtaining a protocol for extraction of phenolics from acai fruit pulp through Placket-Burman design and response surface methodology, *Food Chemistry* **210** (2016) 189-199.

23. Myers R.H., Khuri A.I., Carter W.H. - Response Surface Methodology:1966-1988, Technometrics **31** (2) (1989) 137-157.
24. Plackett R.L., Burman J.P. - The design of optimum multifactorial experiments, Biometrika **33** (4) (1946) 305-325.
25. Kai W., Peisheng Y. - Optimization of lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using response surface methodology, Bioengineered **7** (5) (2016) 298-303.
26. Deng B., Liu Z. and Zou Z. - Optimization of microwave-assisted extraction saponins from *Sapindus mukorossi* pericarps and an evaluation of their inhibitory activity on xanthine oxidase, Journal of Chemistry **2019** (2019) 5204534.
27. Zhang X., Gu, C., Ahmad B., Huang L. - Optimization of extract method for *Cynomorium songaricum* Rupr. by response surface methodology, Journal of Analytical Methods in Chemistry **2017** (2017) 1-7.

ABSTRACT

OPTIMIZATION CONDITIONS FOR EXTRACTION OF SAPONIN TRITERPENOID FROM *Camellia oleifera* BY SURFACE RESPONSE METHOD (RSM)

Do Thi Mai Trinh^{1*}, Truong Minh Ngoc¹, Nguyen Thi Lien¹, Nguyen Thi Hanh²

¹Branch of National Center for Technological Progress in HCM City

²Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: dothimaitrinh24@gmail.com

The study aimed to investigate some of factors affecting the extraction of triterpenoid saponins from the residue of seeds of *Camellia oleifera* by ethanol solvent. The influence of factors including solvent concentration (ethanol), material/solvent ratio, and extraction time were investigated in turn. The content of triterpenoid saponins was determined by UV-Vis spectrophotometric method after sample extraction and rosenthaler coloration reaction of saponins with reagents of perchloric acid and vanillin in acetic acid gave the product a lilac purple color. Optimization of extraction conditions was performed by Response Surface Method (RSM) combined with the complex center model (CCD). The residue of seeds of *Camellia oleifera* was purchased from the local oil press at Quang Thanh facility, Nghe An province, then dried at 105 °C for 5 hours, was used for the experiments. According to the CCD model, the optimal results showed that the triterpenoid saponin content 5.451% at the liquid-solid ratio 19: 1 (v/w), the EtOH concentration 80%, and the time 77 hours. The experimental results show high compatibility with the model.

Keywords: *Camellia oleifera*, concentration of triterpensaponin, response surface model.