BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

NGHIÊN CỨU SẤY KHÔ, CHIẾT TÁCH VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 2 CÂY DƯỢC LIỆU ĐAN SÂM (*SALVIA MILTIORRHIZA* BUNGE) VÀ BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS POLYPHYLLA* SMITH) ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG PHÁT TRIỂN THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA – 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

NGHIÊN CỨU SẤY KHÔ, CHIẾT TÁCH VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA 2 CÂY DƯỢC LIỆU ĐAN SÂM (*SALVIA MILTIORRHIZA* BUNGE) VÀ BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS POLYPHYLLA* SMITH) ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG PHÁT TRIỂN THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

Ngành đào tạo: Công nghệ Thực phẩm
Mã số: 9540101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
1.
2.

Phản biện 1: ……
Phản biện 2: ……
Phản biện 3: ……

KHÁNH HÒA - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả của luận án: **"Nghiên cứu sấy khô, chiết tách và đánh giá hoạt tính sinh học của 2 cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) định hướng ứng dụng phát triển thực phẩm chức năng"** là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi, tuân thủ đúng các quy định về liêm chính học thuật; các dữ liệu và kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án là trung thực và chưa từng được ai khác công bố trong bất cứ công trình khoa học nào cho tới thời điểm này.

Khánh Hòa, ngày …… tháng ... năm 2026

Tác giả luận án

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian thực hiện luận án, tôi đã nhận được sự giúp đỡ của Ban Giám hiệu Trường Đại học Nha Trang, Ban Giám hiệu Trường Thủy sản và Khoa học Sự sống, Ban lãnh đạo Khoa Công nghệ Thực phẩm, Phòng Đào tạo Sau đại học (nay là Phòng Đào tạo), Trung tâm Thí nghiệm Thực hành (nay là Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao). Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ, hỗ trợ nhiệt tình này.

Tôi xin chân thành cảm ơn người hướng dẫn khoa học đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm nghiên cứu và giúp đỡ tôi hoàn thành tốt luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến các Thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi hoàn thành luận án. Xin cảm ơn các em sinh viên các khóa 60, 61, 62, 63 đã hỗ trợ, đóng góp công sức vào quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, người thân, bạn bè đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Khánh Hòa, ngày …… tháng ... năm 2026

Tác giả luận án

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT v
DANH MỤC BẢNG BIỂU vii
DANH MỤC HÌNH ẢNH ix
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN x
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 4
1.1. Tổng quan về nguyên liệu 4
1.1.1. Cây Đan sâm (Salvia miltiorrhiza *Bunge*) 4
1.1.2. Cây Bảy lá một hoa (Paris polyphylla *Smith*) 10
1.2. Tổng quan về sấy và ảnh hưởng đến chất lượng nguyên liệu thực vật 17
1.2.1. Tổng quan về quá trình sấy nguyên liệu thực vật 17
1.2.2. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của phương pháp sấy đến chất lượng nguyên liệu 19
1.3. Tổng quan về chiết tách hoạt chất sinh học từ nguyên liệu thực vật 21
1.3.1. Khái niệm về chiết tách 21
1.3.2. Phương pháp chiết tách hoạt chất sinh học từ nguyên liệu thực vật 21
1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết tách 22
1.3.4. Nghiên cứu về tách chiết rễ ĐS và BLMH 24
1.4. Tổng quan về công nghệ vi bao chiết xuất từ thực vật 26
1.4.1. Khái niệm và mục đích của vi bao trong công nghệ thực phẩm 26
1.4.2. Các chất bao màng trong vi bao chiết xuất từ thực vật 27
1.4.3. Các phương pháp vi bao 29
1.4.4. Các chỉ tiêu đánh giá bột vi bao 29
1.4.5. Các nghiên cứu thực nghiệm về hệ vi bao đa cấu tử 30
1.5. Tổng quan về hoạt tính và đánh giá hoạt tính sinh học 31
1.5.1. Hoạt tính chống oxy hóa 32
1.5.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro* 33
1.5.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* 33
1.5.4. Một số nghiên cứu liên quan đến việc đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* đối với hai cây dược liệu ĐS và BLMH 34
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 36
2.1. Nguyên liệu và hóa chất 36
2.1.1. Nguyên liệu 36
2.1.2. Hóa chất, thiết bị, dụng cụ 37
2.2. Phương pháp nghiên cứu 38
2.2.1. Bố trí thí nghiệm tổng quát 38
2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định điều kiện sấy phù hợp 39

2.2.3. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu điều kiện chiết 42
2.2.4. Bố trí thí nghiệm tạo bột vi bao từ rễ ĐS và thân rễ BLMH.....48
2.3. Phương pháp phân tích 51
2.3.1. Phương pháp xác định các tính chất hóa lý.....51
2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng hoạt chất sinh học.....57
2.3.3. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*.....59
2.3.4. Phương pháp phân tích kim loại nặng.....60
2.3.5. Phương pháp phân tích vi sinh vật và đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro* 60
2.3.6. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* 61
2.3.7. Phân tích thống kê.....62
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 63
3.1. Nghiên cứu điều kiện sấy 63
3.1.1. Nghiên cứu điều kiện sấy rễ ĐS 63
3.1.2. Nghiên cứu điều kiện sấy thân rễ BLMH 78
3.2. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết 92
3.2.1. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết rễ ĐS.....92
3.2.2. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết thân rễ BLMH.....103
3.3. Kết quả đánh giá các tính chất của bột vi bao rễ ĐS và thân rễ BLMH 115
3.3.1. Kết quả phân tích bột vi bao rễ ĐS.....115
3.3.2. Kết quả phân tích bột vi bao thân rễ BLMH.....127
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ 140
4.1. Kết luận.....140
4.1.1. Điều kiện sấy rễ ĐS và thân rễ BLMH 140
4.1.2. Điều kiện chiết tối ưu rễ ĐS và thân rễ BLMH 140
4.1.3. Điều kiện sản xuất bột vi bao rễ ĐS và thân rễ BLMH.....140
4.2. Khuyến nghị 141
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ 142
TÀI LIỆU THAM KHẢO 143
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết	Tiếng Việt	Tiếng Anh
ABTS	-	2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
AE	Tương đương atropine	Atropine equivalents
ARSC	Khả năng khử gốc tự do ABTS	ABTS radical scavenging capacity
a_w	Hoạt độ nước	Water activity
BBD	Mô hình Box-Behnken	Box-Behnken Design
BLMH	Bảy lá một hoa	-
CE	Chiết truyền thống	Conventional extraction
DLS	Phương pháp tán xạ ánh sáng động	Dynamic Light Scattering
DM	Chất khô	dry matter
DPPH	-	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DRSC	Khả năng khử gốc tự do DPPH	DPPH radical scavenging capacity
DSC	Phân tích nhiệt quét vi sai	Differential Scanning Calorimetry
DY	Hiệu suất sấy	Drying yield
ĐS	Đan sâm	-
EE	Tương đương escine	Escine equivalents
EY	Hiệu suất chiết	Extraction yield
FRAP	Khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt	Ferric reducing antioxidant power
FRD	Sấy đông khô	Freeze-drying
FS	Mẫu tươi	Fresh sample
GA	-	Gum arabic
GAE	Tương đương acid gallic	Gallic acid equivalents
HAD	Sấy không khí nóng	Hot-air drying
IRD	Sấy hồng ngoại	Infrared drying
KHP	Không phát hiện	-
LAD	Sấy lạnh	Low temperature air drying
MAE	Chiết hỗ trợ vi sóng	Microwave-assited extraction
MCS	Tinh bột ngô biến tính	Modified corn starch

MD	-	Maltodextrin
MIC	Hàm lượng ức chế tối thiểu	Minimum Inhibitory Concentration
MWD	Sấy vi sóng	Microwave drying
PEC		pectin
RSM	Phương pháp bề mặt đáp ứng	Respond surface methodology
SD	Phơi	Solar drying
SEE	Hiệu suất chiết saponins	Saponins extraction efficiency
SEM	Kính hiển vi điện tử quét	Scanning Electron Microscopy
TAC	Hàm lượng alkaloid tổng số	Total alkaloids content
TE	Tương đương Trolox	Trolox equivalents
TFC	Hàm lượng flavonoids tổng số	Total flavonoids content
TGA	Phân tích nhiệt trọng lượng	Thermogravimetric Analysis
TPC	Hàm lượng phenolics tổng số	Total phenolics content
TPTZ		2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
TSC	Hàm lượng saponins tổng số	Total saponins content
UAE	Chiết hỗ trợ siêu âm	Ultrasound-assited extraction
XRD	Nhiễu xạ tia X	X-ray Diffraction

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2. 1. Phương pháp và điều kiện sấy nguyên liệu.....41
Bảng 2. 2. Điều kiện chiết để lựa chọn của dung môi phù hợp.....44
Bảng 2. 3. Điều kiện chiết để lựa chọn phương pháp chiết phù hợp 44
Bảng 2. 4. Bảng thông số khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chiết rễ ĐS 45
Bảng 2. 5 Bảng khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chiết thân rễ BLMH.....47
Bảng 2. 6. Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ dịch cô quay/hỗn hợp chất bao màng và tỷ lệ các chất trong hỗn hợp bao màng.....50
Bảng 2. 7. Các phương pháp phân tích kim loại nặng 60
Bảng 2. 8. Các phương pháp phân tích vi sinh vật.....60

Bảng 3. 1. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến màu sắc của rễ ĐS sấy khô.....65
Bảng 3. 2. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của rễ ĐS 69
Bảng 3. 3. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hàm lượng hoạt chất sinh học rễ ĐS 71
Bảng 3. 4. Hàm lượng hai hoạt chất sinh học trong rễ ĐS sấy khô bằng MWD720 75
Bảng 3. 5. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của rễ ĐS 76
Bảng 3. 6. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến màu sắc của thân rễ cây BLMH 80
Bảng 3. 7. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của thân rễ BLMH.....83
Bảng 3. 8. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hàm lượng các hoạt chất sinh học của thân rễ BLMH.....85
Bảng 3. 9. Hàm lượng hoạt chất sinh học trong thân rễ BLMH 89
Bảng 3. 10. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của thân rễ BLMH 90
Bảng 3. 11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết rễ ĐS 93
Bảng 3. 12. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng chiết rễ ĐS.....95
Bảng 3. 13 Các hệ số của phương trình hồi quy và kết quả phân tích phương sai 98
Bảng 3. 14. Kết quả hàm lượng tổng số hoạt chất, hiệu suất trích ly và khả năng chống oxy hóa dự đoán và thực nghiệm.....102
Bảng 3. 15. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết thân rễ BLMH.....104
Bảng 3. 16. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng chiết thân rễ BLMH 107
Bảng 3. 17. Các hệ số của phương trình hồi quy và kết quả phân tích phương sai 110
Bảng 3.18. Kết quả hàm lượng hàm lượng hoạt chất, hiệu suất trích ly và khả năng chống oxy hóa dự đoán và thực nghiệm.....114
Bảng 3. 19. Kết quả phân tích các tính chất của bột vi bao ĐS 116
Bảng 3. 20. Hàm lượng hoạt chất trong bột vi bao ĐS 123
Bảng 3. 21. Kết quả phân tích vi sinh bột vi bao ĐS 123
Bảng 3. 22. Kết quả phân tích kim loại nặng của bột vi bao ĐS.....124
Bảng 3. 23. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao ĐS 124

Bảng 3. 24. Kết quả xác định MIC của bột vi bao ĐS.....125
Bảng 3. 25. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* của bột vi bao ĐS 126
Bảng 3. 26. Kết quả phân tích các tính chất của bột vi bao BLMH.....128
Bảng 3. 27. Kết quả phân tích vi sinh bột vi bao BLMH.....135
Bảng 3. 28. Kết quả kiểm tra kim loại nặng của bột vi bao BLMH.....135
Bảng 3. 29. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao BLMH.....136
Bảng 3. 30. Kết quả xác định MIC của bột vi bao BLMH.....136
Bảng 3. 31. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* của bột vi bao BLMH.....138

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1. 1. Rễ ĐS....4
Hình 1. 2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất ưa béo trong ĐS [303]....5
Hình 1. 3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất ưa nước trong ĐS [303]....6
Hình 1. 4. Thân rễ BLMH tươi, vùi trong cát và đã rửa sạch....11
Hình 1. 5. Cấu trúc hóa học của polyphyllin D [57]....13
Hình 1. 6. Công thức cấu tạo Falcarindiol [116]....14

Hình 2. 1. Nguyên liệu Rễ ĐS....36
Hình 2. 2. Nguyên liệu thân rễ BLMH....36
Hình 2. 3. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát....38
Hình 2. 4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định điều kiện sấy....39
Hình 2. 5. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định điều kiện chiết....43
Hình 2. 6. Sơ đồ bố trí thí nghiệm sản xuất bột vi bao....48

Hình 3. 1. Đường cong sấy rễ ĐS bằng các điều kiện sấy khác nhau....63
Hình 3. 2 Hình ảnh SEM của 3 mẫu MWD270 (A), MWD450 (B), MWD720 (C)....70
Hình 3. 3. Sắc ký đồ UHPLC của chuẩn Tanshinone I (A), Cryptotanshinone (B), và mẫu MWD720 (C)....74
Hình 3. 4. Đường cong sấy thân rễ BLMH bằng các điều kiện sấy khác nhau....79
Hình 3. 5. Hình ảnh SEM mẫu sấy HAD60 (A), HAD70 (B), SD (C), FRD (D)....84
Hình 3. 6. Sắc ký đồ HPLC của mẫu thân rễ BLMH tươi (B) và HAD60 (C)....88
Hình 3. 7. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện sự ảnh hưởng của từng yếu tố tới TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của dịch chiết rễ ĐS....100
Hình 3. 8. Bề mặt đáp ứng 3D thể hiện sự ảnh hưởng của từng cặp yếu tố tới TSC....102
Hình 3. 9. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện sự ảnh hưởng của từng yếu tố tới TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của thân rễ BLMH....112
Hình 3. 10. Bề mặt đáp ứng 3D thể hiện ảnh hưởng của từng cặp yếu tố tới TSC....113
Hình 3. 11. Phổ thế zeta (A), phân bố kích thước hạt (B) và ảnh SEM (C, D, E) của bột vi bao ĐS....120
Hình 3. 12. Phổ DSC (A), TGA (B) và XRD (C) của bột vi bao ĐS....121
Hình 3. 13. Phổ thế zeta (A), phân bố kích thước hạt (B) và ảnh SEM (C, D, E) của bột vi bao BLMH....131
Hình 3. 14. Phổ DSC (A), TGA (B) và XRD (C) của bột vi bao BLMH....133

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: **Nghiên cứu sấy khô, chiết tách và đánh giá hoạt tính sinh học của 2 cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) định hướng ứng dụng phát triển thực phẩm chức năng.**

Ngành: Công nghệ Thực phẩm

Mã số: 9540101

Khóa: 2021

Người hướng dẫn:

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Nội dung:

1. Luận án đã xác định phương pháp sấy phù hợp nhất đối với rễ Đan sâm là sấy vi sóng ở công suất 720 W và đối với thân rễ Bảy lá một hoa là sấy không khí nóng ở 60 °C. Bột khô có độ ẩm dưới 6,0%, hoạt độ nước dưới 0,5. Đối với rễ Đan sâm, hàm lượng saponin tổng và khả năng bắt gốc tự do DPPH lần lượt đạt 32,00 mg escin/g DM và 17,72 mg Trolox/g DM. Các giá trị tương ứng đối với thân rễ Bảy lá một hoa lần lượt là 27,11 mg escin/g DM và 1,47 mg Trolox/g DM.

2. Luận án đã xác định điều kiện chiết tối ưu cho rễ Đan sâm bằng chiết hỗ trợ siêu âm với ethanol 80% (v/v), 40 °C, 27 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/88 (g/mL); và cho thân rễ Bảy lá một hoa bằng chiết hỗ trợ vi sóng với ethanol 80% (v/v), 27 phút và thời gian bức xạ 8 giây/phút. Ở các điều kiện này, hàm lượng saponin tổng và hiệu suất chiết đạt 68,64 và 65,74 mg escin/g DM, tương ứng 86,07 và 82,44%.

3. Luận án đã xác định được điều kiện vi bao tối ưu cho dịch chiết cô đặc rễ Đan sâm với hệ chất bao maltodextrin/gum arabic/tinh bột ngô biến tính/pectin ở tỷ lệ 5/1/3/1 và cho thân rễ Bảy lá một hoa ở tỷ lệ 3/1/5/1, cùng tỷ lệ dịch chiết cô/chất bao màng 40/60 (theo chất khô). Bột vi bao thu được có độ ổn định nhiệt – hóa học cao, cấu trúc đồng nhất, khả năng bảo vệ hoạt chất tốt, thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật mạnh (MIC khoảng 10-27,5 mg/mL với Đan sâm và 10-25 mg/mL với Bảy lá một hoa) và ức chế mạnh tế bào ung thư, đặc biệt trên dòng SKBR3 với Đan sâm (GI_{50} là 14,7 µg/mL) và MDAMB468 với Bảy lá một hoa (GI_{50} là 6,33 µg/mL).

Người hướng dẫn **Nghiên cứu sinh**

KEY FINDINGS

Thesis title: **Research on drying, extraction, and evaluation of biological activity of two medicinal plants *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Paris polyphylla* Smith for the application in the functional food development.**

Major: Food Technology

Major code: 9540101

PhD Student:

Supervisors:

Institution: Nha Trang University

Key findings:

1. The thesis identified microwave drying at 720 W as the most suitable drying method for *Salvia miltiorrhiza* roots and hot-air drying at 60 °C for *Paris polyphylla* Smith rhizomes. The dried powders exhibited natural color, moisture content below 6.0%, and water activity below 0.5. For *S. miltiorrhiza* roots, the total saponin content and DPPH radical-scavenging capacity were 32.00 mg escin/g DM and 17.72 mg Trolox/g DM, respectively. The corresponding values for *P. polyphylla* rhizomes were 27.11 mg escin/g DM and 1.47 mg Trolox/g DM, respectively.

2. The thesis identified the optimal extraction conditions for *Salvia miltiorrhiza* roots as ultrasound-assisted extraction using 80% (v/v) ethanol, at 40 °C for 27 min, with a material-to-solvent ratio of 1/88 (g/mL); and for *Paris polyphylla* rhizomes as microwave-assisted extraction using 80% (v/v) ethanol for 27 min with an irradiation time of 8 s/min. Under these optimal conditions, the total saponin contents and extraction yields reached 68.64 and 65.74 mg escin/g dry matter, corresponding to 86.07% and 82.44%, respectively.

3. The thesis identified the optimal microencapsulation conditions for concentrated extracts of *Salvia miltiorrhiza* root using a wall-material system of maltodextrin/gum arabic/modified corn starch/pectin at a ratio of 5/1/3/1, and of *Paris polyphylla* rhizome at 3/1/5/1, with an extract-to-wall material ratio of 40/60 (dry basis). The microencapsulated powders exhibited high thermal and chemical stability, uniform structure, and effective protection of bioactive compounds, showing strong antimicrobial activity (MIC 10-27.5 mg/mL for *S. miltiorrhiza* and 10-25 mg/mL for *P. polyphylla*) and potent anticancer activity, particularly against SKBR3 cells for *S. miltiorrhiza* (GI_{50} 14.7 µg/mL) and MDA-MB-468 cells for *P. polyphylla* (GI_{50} 6.33 µg/mL).

Supervisors **PhD candidate**

MỞ ĐẦU

LÝ DO CHỌN LUẬN ÁN

Hiện nay, việc nghiên cứu, khai thác và ứng dụng các dược liệu tự nhiên trong chăm sóc sức khỏe đang trở thành xu hướng được quan tâm rộng rãi trên toàn cầu. Các sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược, đặc biệt là dạng chiết xuất giàu hoạt chất sinh học, đang được sử dụng ngày càng phổ biến trong ngành dược phẩm và thực phẩm chức năng. Việt Nam là quốc gia có nguồn tài nguyên thực vật phong phú, trong đó nhiều loài dược liệu quý đã được chứng minh có giá trị dược học cao, nhưng vẫn chưa được khai thác hiệu quả theo hướng ứng dụng công nghệ hiện đại để phát triển sản phẩm.

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) là dược liệu được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Hoa và Việt Nam, nổi bật với hoạt tính chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch và chống viêm. Bảy lá một hoa *(Paris polyphylla* Smith) là dược liệu quý hiếm có tác dụng kháng vi sinh vật, ức chế tế bào ung thư và tăng cường miễn dịch nhờ hàm lượng saponin steroid cao. Tuy nhiên, việc chuẩn hóa quy trình sấy khô và chiết tách hoạt chất sinh học của hai loài này còn hạn chế, dẫn đến khó khăn trong việc bảo toàn hoạt tính và mở rộng ứng dụng.

Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện sấy và chiết tách đến hàm lượng hoạt chất sinh học của Đan sâm và Bảy lá một hoa là cần thiết, tạo cơ sở khoa học cho việc ứng dụng trong phát triển thực phẩm chức năng có giá trị sinh học cao và an toàn.

Từ những lý do trên, luận án **"Nghiên cứu sấy khô, chiết tách và đánh giá hoạt tính sinh học của hai cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) định hướng ứng dụng phát triển thực phẩm chức năng"** được lựa chọn thực hiện trong luận án này.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Mục tiêu tổng quát:

Xác định được điều kiện sấy phù hợp nhất cho hai cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) cũng như điều kiện chiết tối ưu để thu nhận tối đa các hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị từ hai cây dược liệu này định hướng phát triển thực phẩm chức năng.

Mục tiêu cụ thể:

- Xác định được điều kiện sấy phù hợp nhất cho hai cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith).

- Xác định được điều kiện chiết tối ưu các hợp chất có hoạt tính sinh học từ hai cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith).

- Thử nghiệm ứng dụng được dịch chiết giàu hoạt chất sinh học từ hai cây dược liệu Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) để sản xuất bột vi bao định hướng phát triển thực phẩm chức năng.

MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Thiết lập cơ sở khoa học và công nghệ cho quy trình sấy và chiết tách hoạt chất sinh học từ hai cây Đan sâm và Bảy lá một hoa, qua đó:

- Góp phần chuẩn hóa quy trình sấy, chiết dược liệu để phục vụ sản xuất chiết xuất khô hoặc bán thành phẩm;

- Cung cấp dữ liệu định lượng để định hướng phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng hoặc chế phẩm hỗ trợ sức khỏe có nguồn gốc thảo dược trong nước.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Đối tượng nghiên cứu: các biến đổi về đặc tính hóa lý, hàm lượng hoạt chất sinh học (saponin, phenolic, tanshinone) và các hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng vi sinh vật, ức chế tế bào ung thư *in vitro*) của rễ Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) và thân rễ Bảy lá một hoa (*Paris polyphylla* Smith) dưới tác động của các điều kiện sấy, chiết tách và vi bao đa cấu tử.

- Phạm vi nghiên cứu:

Về nội dung nghiên cứu: Nghiên cứu tập trung khảo sát ảnh hưởng của một số phương pháp sấy (đông khô, vi sóng, không khí nóng, sấy lạnh, hồng ngoại) đến chất lượng nguyên liệu; tối ưu hóa quá trình chiết tách hoạt chất bằng các kỹ thuật hỗ trợ siêu âm (UAE) và vi sóng (MAE); đồng thời nghiên cứu đánh giá hệ vi bao đa cấu tử (MD–GA–MCS–PEC) từ dịch chiết thu được. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm đặc tính hóa lý, hàm lượng hoạt chất sinh học, hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng vi sinh vật, ức chế tế bào ung thư *in vitro*) và các yếu tố an toàn thực phẩm.

Nghiên cứu được giới hạn ở quy mô phòng thí nghiệm; các đánh giá hoạt tính sinh học được thực hiện bằng phương pháp *in vitro*, không bao gồm các nghiên cứu *in vivo* hoặc phân lập, tinh chế hợp chất riêng lẻ.

Về không gian nghiên cứu: Nguyên liệu được thu hái tại một số vùng trồng dược liệu thuộc các tỉnh phía Bắc Việt Nam (Lai Châu, Yên Bái). Các thí nghiệm công nghệ và phân tích được thực hiện tại các phòng thí nghiệm thuộc Trường Đại học Nha Trang và một số đơn vị nghiên cứu chuyên ngành liên quan.

Về thời gian nghiên cứu: Các nội dung nghiên cứu và thu thập dữ liệu được thực hiện trong giai đoạn từ năm 2022 đến năm 2025.

Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN

- Ý nghĩa khoa học:

Góp phần bổ sung cơ sở khoa học cho quá trình sấy và chiết tách hoạt chất sinh học từ hai cây dược liệu Đan sâm và Bảy lá một hoa, qua đó làm rõ mối tương quan giữa điều kiện xử lý, hiệu suất chiết và hoạt tính sinh học.

Ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng RSM (mô hình tối ưu hóa Box-Behnken) trong nghiên cứu chiết tách dược liệu, cung cấp mô hình toán học và dữ liệu thực nghiệm đáng tin cậy phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng công nghệ vi bao và định hướng phát triển thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên.

- Ý nghĩa thực tiễn:

Kết quả nghiên cứu có thể hỗ trợ các cơ sở sản xuất dược liệu và thực phẩm chức năng trong nước lựa chọn phương pháp sấy và chiết phù hợp, giúp tăng giá trị sử dụng và ổn định chất lượng sản phẩm.

Luận án góp phần bảo tồn, khai thác hợp lý hai loài dược liệu quý, đồng thời mở ra hướng ứng dụng công nghệ cao trong chế biến sâu để nâng cao giá trị kinh tế của dược liệu Việt Nam.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về nguyên liệu

1.1.1. Cây Đan sâm (Salvia miltiorrhiza Bunge*)*

Đan sâm (ĐS) còn được gọi là huyết sâm, xích sâm, huyết căn, tử sâm, đơn sâm… có tên khoa học là *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Theo dân gian, rễ ĐS thường được dùng điều trị kinh nguyệt không đều, đau bụng kinh, huyết tích, đau thắt ngực, mất ngủ, nặng tức ngực, đau nhức xương khớp, chân tay mệt mỏi, đau bụng... [11, 12].

1.1.1.1. Phân loại

ĐS được xác định vị trí trong hệ thống phân loại thực vật như sau:

- Giới: Plantae (Thực vật)
- Ngành: Angiosperms (Thực vật hạt kín)
- Ngành: Eudicots (Thực vật hai lá mầm)
- Nhánh: Asterids (Hoa cúc)
- Bộ: Lamiales (Hoa môi)
- Họ: Lamiaceae (Hoa môi)
- Chi: *Salvia*
- Loài: *S. miltiorrhiza*



Hình 1. 1. Rễ ĐS

1.1.1.2. Phân bố và đặc điểm sinh thái

ĐS là cây thân thảo, sống lâu năm. Thân cây hình trụ nhỏ 4 cạnh, cao 30-80 cm, trên thân có lông mềm ngắn màu vàng nhạt. Rễ cây nhỏ, dài hình trụ, đường kính 0,5-2 cm, dài 10-20 cm, mặt ngoài có màu đỏ nâu, thô ráp, vân nhăn dọc. Vỏ rễ già, màu nâu đỏ, dễ bong ra. Rễ phân thành nhiều rễ con. Lá cây mọc kép, đối xứng với nhau, gồm 3-7 lá chét. Lá có hình trứng hoặc trái xoan, dài 2-7 cm, rộng 0,8-5 cm, gốc tròn, đầu nhọn, mép có răng cưa tù, hai mặt phủ lông mềm, gân lá chằng chịt mạng lưới, làm phiến lá như rộp lên. Hoa mọc thành chùm, nhiều vòng sít nhau ở kẽ lá hoặc đầu ngọn. Mỗi vòng có 3-10 hoa, thường là 5 hoa. Cánh hoa có màu xanh tím nhạt, môi trên hình lưỡi liềm, môi dưới có 3 thùy, thùy giữa có răng cưa hình tròn. Hai nhị ở môi dưới. Bầu nhụy có mỏ dài ở môi trên, hai nhị ở môi dưới. Quả đầu tù, rộng 1,5 mm, dài 3 mm. Mùa hoa từ tháng 5 đến tháng 8 ở Tam Đảo, mùa quả từ tháng 6 đến tháng 9. Rễ được thu hoạch từ mùa thu đến đầu mùa xuân [11, 12].

ĐS mọc ở các vùng ôn đới ẩm và cận nhiệt đới, ở một số tỉnh của Trung Quốc (Tứ Xuyên, An Huy, Sơn Tây, Hà Bắc…) và Nhật Bản. Sau đó di thực vào Việt Nam. ĐS xuất hiện ít trong tự nhiên mà chỉ được trồng là chủ yếu. Cây được trồng ở vùng núi (Tam Đảo, Sa Pa) và đồng bằng (Văn Điển, Hà Nội), các tỉnh ở Tây Bắc (Lào Cai, Hà Giang), Lai Châu và một số nơi khác [11, 12].

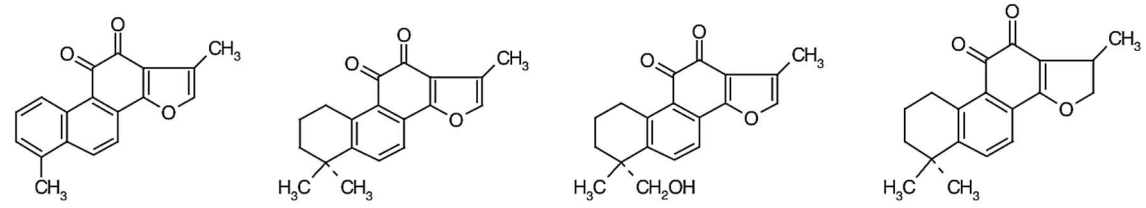
1.1.1.3. Thành phần hóa học của rễ cây ĐS

Theo báo cáo của Mei và cộng sự [158], đến năm 2019 đã xác định được 201 hợp chất hóa học trong ĐS. Trong đó có 81 hợp chất thuộc nhóm kỵ nước, chủ yếu là các diterpenoid và các dẫn xuất quinone có liên quan; 43 hợp chất thuộc nhóm ưa nước, chủ yếu là các acid phenolic; và 77 hợp chất khác thuộc nhiều nhóm cấu trúc khác nhau.

a. Nhóm Diterpenoid

Diterpenoid trong ĐS có chung bộ khung cấu trúc gồm 20 nguyên tử cacbon, sắp xếp tạo thành các vòng theo khung abietane đặc trưng. Đây là nhóm hợp chất kỵ nước đóng vai trò thành phần hoạt tính sinh học chủ yếu của dược liệu. Dựa trên đặc điểm cấu trúc chromophore quinone, các diterpenoid của ĐS được chia thành hai nhóm chính:

Tanshinone: Đây là nhóm phân tử mang chromophore ortho-naphthoquinone giúp tạo nên màu đặc trưng của dược liệu. Nhóm này bao gồm các hợp chất như tanshinone I, tanshinone IIA, tanshinone IIB, cryptotanshinone… Trong đó, tanshinone IIA là thành phần đại diện quan trọng nhất trong ĐS, được coi là chất chỉ thị trong nhiều tiêu chuẩn kiểm nghiệm và được nghiên cứu sâu rộng về các hoạt tính dược lý.

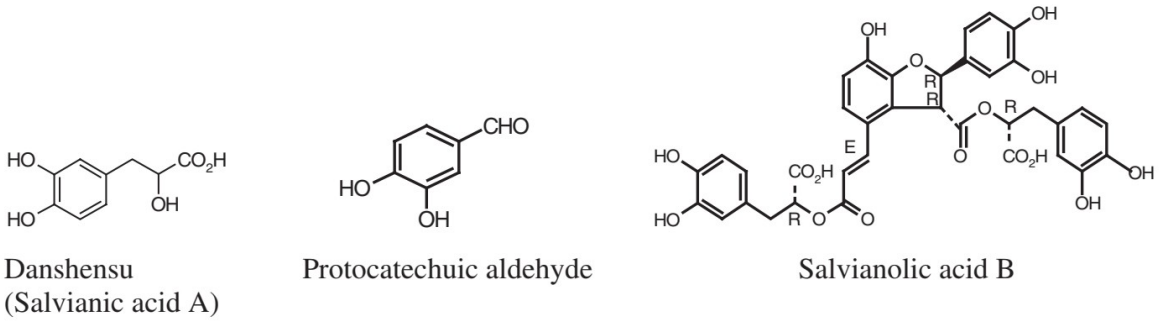


Hình 1. 2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất ưa béo trong ĐS [302]

Royleanone: Nhóm này thuộc loại abietane diterpene, có hệ mang màu para-naphthoquinone. Tuy số lượng ít hơn so với nhóm tanshinone, nhưng một số hợp chất royleanone cũng thể hiện hoạt tính sinh học đáng chú ý và tham gia vào cơ chế bảo vệ mô cơ thể khỏi stress oxy hóa.

b. Nhóm acid phenolic

Từ những năm 1980, các nghiên cứu tại Trung Quốc và Nhật Bản đã phân lập và nhận diện nhóm hợp chất này, ghi nhận hơn 20 acid phenolic khác nhau [23, 138], bao gồm danshensu, acid caffeic, acid protocatechuic, cùng nhiều dẫn xuất phức tạp hơn. Phần lớn acid phenolic trong ĐS có nguồn gốc cấu trúc từ danshensu và các dẫn xuất (hoặc dimer) của acid caffeic, trong đó tiêu biểu là các acid salvianolic (A-E), acid lithospermic và acid rosmarinic.



Hình 1. 3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất ưa nước trong ĐS [302]

c. Các thành phần khác

Các hợp chất khác trong ĐS bao gồm tinh dầu, triterpenoid, flavonoid, acid amin, nguyên tố vi lượng và kim loại…

1.1.1.4. Tính chất dược học

a. Chống viêm nhiễm

Chen và cộng sự [55] chứng minh rằng acid savianolic B có đặc tính chống viêm, cùng với tác dụng ức chế cholesterol xấu đã được biết đến trước đây, có thể giải thích đặc tính chống xơ vữa động mạch của chúng.

Tanshinone IIA đã được ứng dụng trong điều trị nhiều bệnh lý liên quan đến tổn thương mô và viêm mạn tính, như tổn thương phổi cấp, tổn thương thận cấp, xơ hóa, Alzheimer và xơ vữa động mạch [112, 149, 226, 274]. Nghiên cứu của Yang và cộng sự (2016) [278] cho thấy Tanshinone IIA có thể chống viêm/ xơ vữa động mạch là do làm giảm phân tử bám dính tế bào mạch máu và nội bào.

Cryptotanshinone [236] trong ĐS được ghi nhận làm gián đoạn quá trình truyền tín hiệu kích hoạt phản ứng viêm ở mức độ tế bào, từ đó hạn chế sự hình thành và giải phóng các cytokine tiền viêm.

Một số hợp chất khác dù hiện diện với hàm lượng thấp hơn nhưng lại cho thấy hoạt tính chống viêm mạnh hơn cả tanshinone IIA, như tanshinone IIB, danshixinkun B, danshenol A, arucadiol, tanshindiol C, salviolone, sugiol… [154]. Ở nhóm acid phenolic, acid salvianolic B cũng đã được chứng minh có tiềm năng điều trị các bệnh liên quan đến viêm mạch máu và rối loạn chức năng nội mô thành mạch [272, 275].

b. Chống oxy hóa

Acid salvianolic A và acid salvianolic B được ghi nhận có tác dụng bảo vệ tim mạch chủ yếu thông qua khả năng trung hòa các gốc tự do và ức chế stress oxy hóa [99]. Đặc biệt, acid salvianolic B không chỉ thể hiện hoạt tính khử gốc tự do DPPH *in vitro*, mà còn hiệu quả trong việc ngăn cản quá trình oxy hóa LDL do ion Cu^{2+} cảm ứng, vốn là một bước quan trọng trong cơ chế hình thành mảng xơ vữa động mạch [268].

Tanshinone IIA thể hiện vai trò bảo vệ thần kinh và gan nhờ cơ chế chống oxy hóa, giúp giảm tổn thương tế bào thần kinh trong đột quỵ thiếu máu cục bộ và ngăn ngừa tiến triển xơ gan [38, 80, 101]. Tanshione I có hoạt tính chống oxy hóa đáng kể, giúp bảo vệ ti thể khỏi stress oxy hóa do H_2O_2 và bảo vệ tế bào thần kinh của não chuột trước tổn thương do thiếu máu tức thời [182, 191].

Chen và cộng sự [50] còn chứng minh rằng các polymer của acid caffeic (bao gồm acid lithospermic B và muối Mg^{2+} của nó, acid lithospermic, và acid rosmarinic) có khả năng loại bỏ gốc DPPH mạnh hơn bản thân acid caffeic đơn phân, cho thấy việc polymer hóa trong cấu trúc tự nhiên của ĐS giúp tăng cường hiệu lực chống oxy hóa.

c. Chống ung thư

Nghiên cứu của Wu và cộng sự (2016) [265] cho thấy dịch chiết rễ ĐS có khả năng ức chế sự tăng sinh và cảm ứng nhạy cảm tế bào ở nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau.

Chen và cộng sự [53] cho thấy tanshinone có thể ức chế tăng sinh tế bào ung thư, cảm ứng quá trình tự chết tế bào, ức chế xâm lấn - di căn, đồng thời ngăn chặn quá trình hình thành mạch máu mới *in vitro*. Tanshinone IIA đã được chứng minh có khả năng ức chế nhiều loại ung thư khác nhau, gồm ung thư phổi [126], dạ dày [283], thực quản [289], khoang miệng [74], máu [233]. 15,16-cryptotanshinone cho thấy hiệu quả đáng kể với tế bào ung thư xương [54].

Acid salvianolic A đã được chứng minh có tác dụng ức chế ung thư vú [257], acid salvianolic B có khả năng ức chế tăng sinh và phát triển khối u thần kinh đệm [261].

d. Tác dụng đối với hệ tim mạch

Dịch chiết ĐS 5% trong nước có thể làm giảm diện tích mảng xơ vữa ở đoạn động mạch chủ bụng trên chuột được cho ăn khẩu phần giàu cholesterol [268]. Tanshinone IIA [56, 99], cryptotanshinone [147, 204, 300] đều thể hiện khả năng ức chế tiến triển xơ vữa, thông qua cơ chế giảm stress oxy hóa, ức chế viêm nội mô và cải thiện chức năng tế bào mạch máu. Chế phẩm tiêm ĐS đã được báo cáo có khả năng giảm hoạt tính của các glycoprotein màng tiểu cầu, từ đó giảm kết tập tiểu cầu và cải thiện lưu thông máu cho bệnh nhân mắc bệnh mạch máu [293].

ĐS có lợi khi điều trị chứng huyết khối tĩnh mạch sâu nhờ tác dụng chống oxy hóa cho tế bào nội mô mạch máu [44]. Đồng thời, ĐS còn giúp cải thiện tuần hoàn máu, phù hợp với công năng được ghi nhận trong y học cổ truyền [150]. Acid salvianolic A có thể làm giảm độ bám dính của tiểu cầu trên bề mặt collagen, từ đó hạn chế giai đoạn đầu của quá trình hình thành huyết khối [105]. Acid rosmarinic cũng được chứng minh có tác dụng ức chế sự hình thành huyết khối và giảm đông tụ tiểu cầu, mức ức chế 54,8% và 46,4% ở liều 100 mg/kg thể trọng trong mô hình thí nghiệm [114].

Trên mô hình động vật, việc sử dụng dịch chiết ĐS đường uống ở liều 4,6 g/kg hoặc 14 g/kg thể trọng trong 21 ngày làm giảm tình trạng tăng huyết áp do monocrotaline gây ra [258]. Dịch chiết nước của ĐS còn ức chế hoạt tính enzyme chuyển đổi angiotensin, qua đó điều hòa hệ renin–angiotensin, giúp cải thiện huyết áp [120]. Ngoài ra, ĐS có khả năng ức chế tái cấu trúc thành mạch và giảm mất cân bằng oxy hóa ở chuột tăng huyết áp [290]. Đặc biệt, một nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phối hợp tối ưu giữa acid salvianolic A, acid salvianolic B, danshensu và protocatechuic aldehyde có hiệu quả chống tăng huyết áp mạnh hơn cả bột rễ ĐS sấy đông khô, nhờ cải thiện tái tạo thành mạch và điều hòa stress oxy hóa hiệu quả hơn [290]. Natri tanshinone IIA sulfonate [254], acid salvianolic B [143] cũng đã được chứng minh có tác dụng hạ huyết áp thông qua cải thiện chức năng nội mô và điều hòa trương lực mạch.

e. Tác dụng chống xơ hóa

Nghiên cứu cho thấy ĐS có thể chống lại xơ hóa gan do tình trạng quá tải sắt mạn tính, thông qua việc ức chế tích lũy sắt và collagen, giảm stress oxy hóa, phản ứng viêm và apoptosis trong tế bào nhu mô gan [299]. Tương tự, dịch chiết nước nóng từ rễ ĐS cũng có khả năng ức chế xơ hóa và quá trình peroxid hóa lipid trong mô hình chuột bị xơ gan do tắc mật [162]. ĐS kết hợp với chiết xuất Boswellia được ghi nhận ngăn ngừa

xơ gan trên nền viêm gan mạn tính [217]. Tanshinone IIA cũng có thể bảo vệ gan trước tổn thương do acetaminophen gây ra [255]. Cryptotanshinone [116], dihydrotanshinone I [83], aldehyde protocatechuic [151], acid salvianolic A [73], acid salvianolic B [152], magie lithospermate B [185] và acid lithospermic [46] đều có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ gan.

Dai và cộng sự (2004) [64] cho thấy rễ ĐS có hiệu quả điều trị xơ phổi tốt hơn một số dược liệu truyền thống khác, nhờ khả năng cải thiện vi tuần hoàn và ức chế quá trình hình thành sợi collagen. Tanshinone IIA [93], acid salvianolic A [187] cũng cho thấy có tiềm năng điều trị đối với bệnh xơ phổi.

ĐS có tác dụng bảo vệ tổn thương thận do nhồi máu cơ tim nhờ phục hồi chức năng thận và ngăn ngừa sự mất cân bằng oxy hóa [271]. Dịch chiết nước từ rễ ĐS có khả năng chống oxy hóa, giảm phù nề tế bào biểu mô ống thận, cải thiện chức năng lọc cầu thận [95], có hiệu quả trong điều trị tổn thương thận do thiếu máu cục bộ [52]. Tanshinone IIA giảm tổn thương biểu mô ống thận và ức chế viêm cục bộ [112], ngăn chặn tiến triển bệnh thận mạn ở chuột bị tổn thương thận cấp [111]. Acid lithospermic B có tác dụng cải thiện tổn thương thận nhờ loại bỏ các loại oxy phản ứng [119]. Mg lithospermate B phục hồi chức năng thận do tuổi tác bằng cách điều hòa hoạt tính NADPH oxidase và cân bằng sản xuất gốc oxy phản ứng [190].

f. Tác dụng đối với bệnh tiểu đường

Theo Huang và cộng sự (2012) [104] acid polyphenolic tổng số của ĐS có tác dụng tích cực trên chuột mắc bệnh tiểu đường loại 2. Acid salvianolic A có thể giúp chân của chuột mắc bệnh tiểu đường khỏi các bệnh thần kinh và rối loạn chức năng tuần hoàn mạch máu ngoại biên [281]. Acid salvianolic B có tác dụng trị tiểu đường vì có thể làm giảm sự mất cân bằng oxy hóa, ngăn ngừa sự chết theo lập trình của tế bào, ức chế tế bào nội mô…[205]. Danshensu cũng có tác dụng đáng kể đối với bệnh tiểu đường [102]. Thuốc tiêm ĐS đã được ghi nhận có khả năng bảo vệ thận do bệnh tiểu đường gây ra nhờ ức chế sự mất cân bằng oxy hóa, giảm viêm nhiễm và xơ hóa mô thận [273], cải thiện bệnh lý hình thái của vi ống thận và bảo vệ chức năng do giảm độc tính tăng đường huyết [282].

1.1.1.5. Tác dụng phụ

Mặc dù ĐS có tiềm năng hỗ trợ điều trị cao huyết áp, việc sử dụng ở phụ nữ mang thai cần được cân nhắc thận trọng. Một số hợp chất hoạt tính trong ĐS có thể ảnh hưởng

đến cơ chế điều hòa huyết áp, trong khi việc can thiệp vào các cơ chế này ở giai đoạn muộn của thai kỳ đã được chứng minh có thể gây bất lợi cho thai nhi [140].

Thuốc tiêm từ ĐS có một số tác dụng phụ như đau đầu, đỏ mặt, ngứa, giảm tiểu cầu miễn dịch, rối loạn chức năng gan… [48, 145]. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2016) [252] cho thấy sử dụng thuốc tiêm Danshen liều cao (5,76 g/kg.ngày) có thể gây độc tính mạch máu ngoại biên và sự chết theo chương trình của các tế bào nội mô mạch máu. Ngoài ra, Liu và cộng sự (2014) [145] đã phát hiện một số tác dụng phụ nhỏ ở mức chấp nhận được khi sử dụng thuốc tiêm ĐS, như khó chịu ở dạ dày, ngứa, đau cục bộ.

Nói chung đến nay, chưa có báo cáo nào về tác dụng phụ nghiêm trọng liên quan đến việc sử dụng ĐS ở liều thông thường [158].

1.1.2. Cây Bảy lá một hoa (Paris polyphylla Smith*)*

Cây Bảy lá một hoa (BLMH) còn có tên khác như Thất diệp Nhất chi hoa, Tảo Hưu, Độc cước liên, Thảo Hà xa… Thân rễ của loại cây này cũng được sử dụng rộng rãi trong Y học Cổ truyền Việt Nam [11, 12], Trung Quốc [75, 201], Ấn Độ [192].

1.1.2.1. Phân loại thực vật

Cây BLMH được phân loại theo hệ thống phân loại thực vật có hoa như sau:

- Giới: Plantae (Thực vật)
- Ngành: Angiospermae (Thực vật hạt kín)
- Ngành: Monocots (Thực vật một lá mầm)
- Bộ: Liliales (Loa kèn)
- Họ: Melanthiaceae (Hắc dược hoa)
- Chi: *Paris* (Trọng lâu)
- Loài: *P. polyphylla*

1.1.2.2. Phân bố và đặc điểm hình thái

Cây BLMH ưa bóng, ưa ẩm, mọc dưới các tán rừng rậm nhiệt đới, có tán che hoặc dọc các khe suối, đất ẩm nhiều mùn, trên núi đá vôi ở độ cao 1300-2500 m so với mực nước biển [11]. Chi *Paris* mọc rộng rãi ở Tây Nam Trung Quốc (Vân Nam, Tứ Xuyên) [219], Bắc Việt Nam, Bắc Myamar và Nhật Bản [75]. Tại Việt Nam, cây BLMH phân bố chủ yếu ở Mộc Châu (Sơn La), Đồng Văn (Hà Giang), Cúc Phương (Ninh Bình), Sa Pa (Lào Cai), Đà Bắc (Hòa Bình), Kon Plong (Kontum), Con Cuông (Nghệ An), Nam Giang (Quảng Nam), Bố Trạch (Quảng Bình), Lạc Dương (Lâm Đồng) [11, 12]. Theo

Zhang và cộng sự (2011) [291], chi này có 24 loài phân bố khắp thế giới, trong đó 19 loài ở Trung Quốc. Theo Dược điển Trung Quốc (2015) [63], chi *Paris* gồm 33 loài và 15 thứ.



Hình 1. 4. Thân rễ BLMH tươi, vùi trong cát và đã rửa sạch

Cây BLMH là cây thân thảo, sống lâu năm. Thân rễ dài 5-15 cm, đường kính 2-2,5 cm, chia nhiều đốt. Từ thân rễ mọc lên thân cây thẳng đứng, cao khoảng 1 m và không phân nhánh. Thân rễ có 1-2 chồi ngủ qua mùa đông và mọc lại vào giữa mùa xuân năm sau. Trong tự nhiên, những cây lớn với thân rễ có chiều dài hơn 5 cm mới có hoa quả. Giữa thân có một tầng lá (gồm 3-10 lá, thường là 7 lá) mọc vòng tròn. Phiến lá hình mũi mác, dài 15-21 cm và rộng 4-8 cm, cuống lá dài 3-6 cm. Hai bên mặt lá nhẵn, mép không có răng cưa, mặt dưới có màu xanh lục nhạt hay màu tím nhạt. Mỗi cây chỉ có một hoa mọc đơn độc ở đỉnh cành, cách tầng lá 15-30 cm, cuống hoa dài 15-30 cm. Mùa hoa thường vào tháng 3 đến tháng 5. Mỗi hoa đều có lá đài, dài 3-7 cm, mọc rời nhau. Số lá đài xấp xỉ số lá và số cánh hoa. Nhụy hoa có màu tím đỏ. Cây có quả mọng, mùa quả thường vào tháng 10-11. Quả khi chín có màu tím đen, tách ra, để lộ hạt nhỏ màu đỏ. Quả trưởng thành chứa 50-60 hạt [11, 12]. Nghiên cứu sinh thái ở Nepal của Kunwar và cộng sự (2020) [132] cho thấy khả năng tái sinh cây trong tự nhiên khá thấp, vì hạt có thời gian nghỉ dài, mất 7-8 tháng để hạt nảy mầm. Do đó, cây chủ yếu được tái sinh bằng sinh sản vô tính [20].

1.1.2.3. Thành phần hóa học của thân rễ cây BLMH

Đến năm 2020, đã phân lập và xác định được hơn 320 hợp chất từ loài Paris, trong đó chủ yếu là saponin steroid, saponin cholestanol, C-21 steroid, phytosterol, các hợp chất tương tự hormone lột xác côn trùng, triterpenes, các chất trao đổi thứ cấp khác. Ngoài ra, thân rễ (và các bộ phận khác như thân, lá) của *P. polyphylla* chứa các thành phần hoạt tính quan trọng bao gồm polysaccharide, flavonoid, acid amin… [218]

a. Saponin

Saponin là nhóm hợp chất glycoside trong đó phần aglycone (còn gọi là sapogenin) không tan trong nước và thường thuộc cấu trúc steroid hoặc triterpenoid, liên kết với một hoặc nhiều phân tử đường tan trong nước như glucose, galactose, pentose, ketose, hoặc acid uronic. Dựa trên cấu trúc của sapogenin, saponin được phân thành hai nhóm chính, gồm triterpenoid saponins và steroidal saponins. Đối với *P. polyphylla*, các steroidal saponins (aglycone thuộc dạng spirostanol hoặc furostanol, có khung 27 carbon) chiếm ưu thế và được xem là thành phần hoạt tính chủ đạo, chiếm khoảng 50-55% tổng số hợp chất phân lập được từ thân rễ [75].

Wang và cộng sự (2005) [259] phân tách từ thân rễ *P. polyphylla* 2 hợp chất mới gồm falcarindiol, β-ecdysterone, và 6 hợp chất saponin đã được biết tới.

Devkota và cộng sự (2007) [71] đã phân tách được 4 hợp chất đã biết từ thân rễ *P. polyphylla* ở Nepal.

Yun và cộng sự (2007) [286] phân tách và xác định được hợp chất saponin steroid (3β,21-dihydroxypregnane-5-en-20S-(22,16)-lactone-1-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→2) -[β-D-xylopyranosyl (1→3)] - β-D-glucopyranoside) trong thân rễ cây BLMH.

Zhao và cộng sự (2009) [301] đã phân tách thêm 2 saponin furostanol và 1 saponin spirostanol từ thân rễ *P. polyphylla* var. *Yunnanensis*. Cùng năm, Zhang và cộng sự [296] đã định tính và định lượng được 10 saponin trong *P. polyphylla* var. *yunnanensis* và 7 saponin trong *P. polyphylla* var. *chinensis*.

Wu và cộng sự (2012) [267] phân tách được 18 saponin steroid, trong đó 11 loại chưa được biết đến. Qin và cộng sự [201] phân tách được 1 sapogenin và 24 saponin steroid, trong đó có 6 glycosides mới, đặt tên là chonglouosides SL-1 đến SL-6.

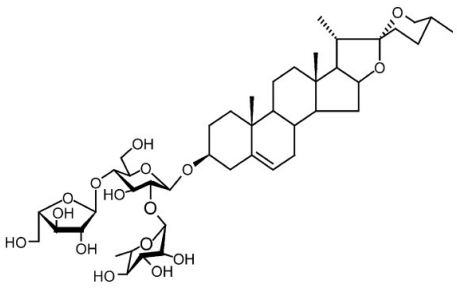
Kang và cộng sự (2012) [121] đã phân tách được 3 saponin steroid mới (parisyunnanosides G–I), 1 glycoside steroid C21 mới (parisyunnanoside J) và 2 hợp chất đã biết (padelaoside B, pinnatasterone và 20-hydroxyecdyson) từ thân rễ *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis.*

Wu và cộng sự (2013) [266] đã phân tách được 6 saponin triterpenoid mới trong thân rễ *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (đặt tên là paritrisides A-F) cùng với 9 saponin triterpenoid đã biết.

Li và cộng sự [139] cũng đã phân tách được 9 saponin steroid gồm PSI, PSII, PSV, PSVI, PSVII, PSH, dioscin, gracillin và PGRR trong thân rễ *P. polyphylla*.

Zhang và cộng sự (2022) [298] đã phân tách và tinh chế polyphyllin II and VII từ thân rễ *P. polyphylla* var. *yunnanensis* bằng nhựa resin Macroporous.

Trong các saponin của *P. polyphylla*, polyphyllin D được xem là một trong những hoạt chất chống ung thư mạnh nhất [20], như ung thư vú [134], ung thư phổi [153]. Nhiều nghiên cứu cho thấy polyphyllin D thể hiện tác dụng gây ngừng chu kỳ tế bào**,** khởi phát apoptosis, hoạt hóa autophagy, ức chế hình thành mạch máu mới, tăng độ nhạy của tế bào ung thư đối với hóa trị liệu và điều hòa các đáp ứng viêm-miễn dịch [241].



Hình 1. 5. Cấu trúc hóa học của polyphyllin D [57]

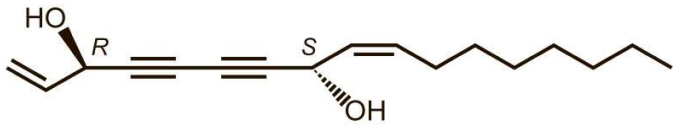
b. Polysaccharide

Thân rễ và các bộ phận khác như thân, lá BLMH còn chứa hàm lượng lớn polysaccharide dao động từ 3,29–12,0%. Các nghiên cứu phân tích cho thấy polysaccharide được cấu tạo từ nhiều loại đường đơn khác nhau, phổ biến nhất là đường đơn như glucose, galactose và arabinose… với khối lượng phân tử dao động từ vài nghìn đến hàng triệu Dalton, cấu trúc có thể ở dạng mạch thẳng hoặc mạch nhánh phức tạp. Riêng thân rễ của cây chứa một lượng lớn tinh bột, điều này gây khó khăn cho việc chiết xuất polysaccharide ở nhiệt độ cao do hiện tượng hồ hóa [218].

c. Các hợp chất khác

Thân rễ *P. polyphylla* còn chứa khoảng 50 hợp chất thứ cấp khác thuộc nhiều nhóm cấu trúc, gồm acid béo (ví dụ: hexadecanoic acid, heptadecenoic acid triglycerides), một số alkaloid ở hàm lượng thấp, quinone**,** acid amin và các acid phenolic như acid gallic. Các thành phần này dù không phải là hoạt chất đặc trưng nhưng góp phần bổ trợ về mặt chống oxy hóa, duy trì cấu trúc sinh học và tăng cường cơ chế bảo vệ thực vật, từ đó tạo nên tác dụng dược lý tổng thể của dược liệu này.

Đặc biệt, Wang và cộng sự (2006) [259] đã phân lập từ thân rễ *P. polyphylla* một hợp chất polyacetylene là falcarindiol, lần đầu tiên ghi nhận trong chi *Paris*. Hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh và được xem như một tác nhân kháng ung thư tiềm năng mới, có khả năng gây stress lưới nội chất và khởi phát apoptosis trên nhiều dòng tế bào ung thư [115]. Ngoài ra, falcarindiol còn cho thấy tác dụng bảo vệ thận trong mô hình gây độc bởi cisplatin, thông qua việc điều hòa các mạng lưới tín hiệu liên quan đến đáp ứng viêm và cân bằng oxy hóa nội bào (bao gồm các trục điều hòa phiên mã và chống oxy hóa), từ đó làm giảm phản ứng viêm và stress oxy hóa [76].



Hình 1. 6. Công thức cấu tạo Falcarindiol [115]

1.1.2.4. Tính chất dược học

Theo Y học cổ truyền, thân rễ *P. polyphylla* có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tiêu thũng, chỉ thống và lương can, thường được áp dụng trong các trường hợp sưng viêm, rắn cắn, mụn nhọt và nhiễm độc [11, 12]. Các nghiên cứu hiện đại đã xác nhận nhiều tác dụng truyền thống này, bao gồm cầm máu, chống viêm [75], kháng khuẩn [68, 201], chống ung thư [75, 267, 301], chống oxy hóa [75, 156]… Đến năm 2020, đã ghi nhận 97 bằng sáng chế liên quan đến chi *Paris* (trong đó chủ yếu là *P. polyphylla*) [194].

a. Chống ung thư

Các nghiên cứu dược học hiện đại đã chứng minh rằng các dịch chiết từ thân rễ, rễ, lá, thân và toàn cây *P. polyphylla* bằng nhiều dung môi khác nhau (methanol, ethanol, petroleum ether, dichloromethan và nước) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào/ức chế tăng sinh rõ rệt đối với nhiều dòng tế bào ung thư, bao gồm ung thư phổi [201], ung thư thực quản [137], ung thư vòm họng [267], ung thư xương [210], ung thư vú, gan, đại tràng [200]… Đặc biệt, Qin và cộng sự (2018) [200] đã cho thấy nhóm hoạt chất saponin là thành phần chính quyết định tác dụng kháng ung thư của dược liệu này.

Các hoạt chất tinh khiết phân lập từ *P. polyphylla* cũng chứng minh hoạt tính kháng ung thư mạnh trên nhiều dòng tế bào khác nhau. Trong đó, polyphyllin D (còn được gọi là paris saponin I**)** là steroidal saponin được nghiên cứu sâu nhất và cho thấy tác dụng ức chế tăng sinh, gây apoptosis và autophagy trên các dòng ung thư vú [134], ung thư

buồng trứng [214], ung thư máu [277], ung thư gan [57], u não [284], ức chế hình thành mạch máu trong vi môi trường khối u [45], ung thư dạ dày [77], ung thư gan [269], ung thư xương [47], ung thư phổi [79]. Nghiên cứu *in vivo* [134] cũng cho thấy polyphyllin D có hiệu quả ức chế phát triển khối u mà không gây độc tính đáng kể đối với cơ quan lành, chứng minh tiềm năng phát triển thành thuốc kháng ung thư nguồn gốc tự nhiên.

Falcarindiol được phân lập từ thân rễ *P. polyphylla* và được ghi nhận hoạt tính độc tế bào rõ rệt [259]

Jiang và các cộng sự (2014) [113] nghiên cứu về saponin kiểu steroid sau đó cho thấy rằng Polyphyllin II ức chế đáng kể các dòng tế bào ung thư gan *in vivo*/*in vitro*.

Paris saponin VI cũng được chứng minh có khả năng ức chế đáng kể sự phát triển của dòng tế bào ung thư gan *in vitro*, thông qua cơ chế cảm ứng apoptosis và ức chế tăng sinh [256]. Polyphyllin VII (Paris saponin VII, dioscinin, chonglouside saponin VII) cũng thể hiện hoạt tính kháng ung thư phổi [79, 94], ung thư gan [256], ung thư não [189], ung thư buồng trứng [279], ung thư cổ tử cung [297]…

Theo Ding và cộng sự (2021) [75], cơ chế chống ung thư của các polyphyllin này chủ yếu là gây chết tế bào theo con đường ty thể**,** ức chế chu kỳ tế bào**,** và ức chế quá trình EMT thông qua việc giảm biểu hiện N-cadherin và tăng E-cadherin, từ đó hạn chế sự di chuyển và xâm lấn của tế bào ung thư.

b. Chống oxy hóa

Dịch chiết methanol, ethanol, petroleum ether, nước và đặc biệt là các steroidal saponin phân lập từ thân rễ thể hiện khả năng quét gốc tự do và ức chế stress oxy hóa [70, 135, 156].

c. Hoạt tính chống viêm, kháng vi sinh vật

Các dịch chiết methanol, ethanol và nước từ lá, thân rễ cũng như toàn cây *P. polyphylla* đã được chứng minh có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn phổ rộng trong các thử nghiệm *in vitro* [68, 118, 156, 200]. Bên cạnh đó, các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ cũng thể hiện khả năng kháng vi sinh vật mạnh hơn. Cụ thể*,* Zhu và cộng sự (2011) [304] đã phân lập được ba steroidal saponin thuộc nhóm pennogenin từ dịch chiết ethanol của *P. polyphylla var. yunnanensis*, trong đó các hợp chất này cho thấy hoạt tính kháng nấm đáng kể đối với *S. cerevisae, C. albicans*.

Năm 2012, Qin và cộng sự [201] đã phân lập một số hợp chất từ *P. polyphylla* và ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đối với *Propionibacterium acnes*, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát viêm da và mụn trứng cá. Đến năm 2018, nhóm nghiên cứu này [200] tiếp tục chứng minh saponin steroid từ thân rễ *P. polyphylla* có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *C. albicans in vitro.* Ngoài ra, nhiều nghiên cứu khác cũng cho thấy các saponin steroid có mức độ kháng khuẩn khác nhau đối với nhiều chủng vi khuẩn, bao gồm *P. aeruginosa* (100%), *S. aureus* (80%), *L. innocua* (65%), *E. coli* (57%), *S. enteric* (67%) và *S. sonnei* (47%) [118, 156, 200].

d. Các hoạt tính khác

Paris saponin II đã được chứng minh có hoạt tính điều hòa miễn dịch và có thể cải thiện chức năng miễn dịch ở bệnh nhân viêm thận lupus [253]. Shan và cộng sự (2010) [221] cũng cho thấy rằng *P. polyphylla var. yunnanensis* có tác dụng ức chế vận động và giảm tỷ lệ sống sót của tinh trùng chuột, qua đó diosgenin được xem như một ứng viên tiềm năng trong phát triển biện pháp tránh thai không chứa hormone. Ngoài ra, dịch chiết methanol từ lá *P. polyphylla* thể hiện hoạt tính kháng virus Chikungunya [118], trong khi Paris saponin I có hoạt tính kháng virus cúm A [199] trong cả nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy saponin steroid tổng số từ thân rễ *P. polyphylla* Smith var. *yunnanensis* có thể làm giảm chảy máu tử cung bất thường, có thể liên quan đến tác dụng điều hòa co bóp tử cung theo chu kỳ. Kết quả này cho thấy thêm tiềm năng tác dụng dược lý đa dạng của nhóm hoạt chất này [90].

e. Tác dụng phụ

Hoạt chất sinh học chính trong thân rễ BLMH là saponin steroid, khi sử dụng ở liều cao hoặc kéo dài, chúng có thể gây độc tính nhất định đối với cơ thể người [75]. Johnson và cộng sự (1986) [117] chứng minh rằng khi nồng độ saponin trong ruột non tăng vượt ngưỡng, chúng có thể làm tăng tính thấm của tế bào biểu mô ruột, dẫn đến sự xâm nhập của các phân tử thông thường không thể hấp thu, từ đó gây kích ứng hoặc xuất huyết ruột non. Jia và cộng sự (2020) [110] báo cáo rằng các chế phẩm từ *P. polyphylla* có thể gây độc tính trên gan thông qua rối loạn chuyển hóa và lipid, trong khi nghiên cứu của Bottger và cộng sự (2013) [36] cho thấy saponin có khả năng tách cholesterol khỏi màng tế bào, làm mất tính ổn định của màng và dẫn đến độc tính tế bào.

1.2. Tổng quan về sấy và ảnh hưởng đến chất lượng nguyên liệu thực vật

1.2.1. Tổng quan về quá trình sấy nguyên liệu thực vật

Sấy là công đoạn quan trọng trong xử lý sau thu hoạch dược liệu, nhằm loại bỏ nước thông qua quá trình truyền nhiệt và truyền khối, từ đó làm giảm hoạt độ nước, ức chế enzyme và vi sinh vật, kéo dài thời gian bảo quản, và thuận tiện cho vận chuyển, lưu trữ [40, 208]. Tuy nhiên, quá trình sấy không chỉ làm giảm độ ẩm mà còn gây ra những biến đổi đáng kể về màu sắc, cấu trúc và thành phần hóa học của nguyên liệu, đặc biệt đối với các hợp chất sinh học như phenolic, tanshinone hay saponin steroid… vốn nhạy cảm với nhiệt, oxy và ánh sáng.

Về bản chất, sự khác biệt giữa các phương pháp sấy chủ yếu nằm ở cơ chế truyền nhiệt và truyền ẩm, từ đó quyết định mức độ biến đổi màu sắc, cấu trúc và khả năng bảo toàn hoạt chất. Trong phương pháp sấy tự nhiên (phơi nắng-SD), nhiệt được truyền chủ yếu thông qua bức xạ nhiệt (bức xạ mặt trời) dưới dạng sóng điện từ (bao gồm tia hồng ngoại và ánh sáng nhìn thấy), kết hợp với các hiện tượng hấp thụ nhiệt và đối lưu để làm nóng vật liệu. Do đó, quá trình tách ẩm diễn ra chậm và phụ thuộc mạnh vào điều kiện môi trường, thời gian sấy kéo dài, làm tăng mức độ tiếp xúc của nguyên liệu với nhiệt, ánh sáng và oxy. Điều này thúc đẩy các phản ứng oxy hóa và phân hủy, dẫn đến suy giảm đáng kể hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học [229].

Trong sấy không khí nóng (HAD), không khí được gia nhiệt và truyền nhiệt đến vật liệu thông qua cơ chế đối lưu, từ bề mặt vào bên trong, tạo nên gradient nhiệt và ẩm. Quá trình này thường gây co rút cấu trúc và giảm độ xốp của vật liệu, từ đó hạn chế khuếch tán ẩm từ bên trong ra ngoài [136]. Ở nhiệt độ cao quá trình sấy có thể nhanh chóng bất hoạt các enzyme oxy hóa (như polyphenoloxidase), nhưng đồng thời thúc đẩy các phản ứng oxy hóa và phân hủy các hợp chất nhạy nhiệt. Ngoài ra, các phản ứng Maillard và caramel hóa cũng được tăng cường, gây biến đổi màu sắc của nguyên liệu [39, 123]. Ngược lại, sấy ở nhiệt độ thấp kéo dài (dưới 50 °C) có thể không đủ để bất hoạt enzyme, làm kéo dài quá trình oxy hóa và gây suy giảm đáng kể các hợp chất nhạy như vitamin C, chlorophyll và các hợp chất phenolic [184, 196].

Đối với sấy hồng ngoại (IRD), năng lượng bức xạ điện từ (bước sóng 0,75-1000 μm) được phát ra từ nguồn hồng ngoại và truyền trực tiếp vào vật liệu mà không cần gia nhiệt không khí xung quanh. Năng lượng này được hấp thụ và chuyển hóa thành nhiệt nội tại, chủ yếu thông qua sự kích thích dao động của các phân tử nước, giúp gia nhiệt

nhanh hơn so với sấy đối lưu. Tuy nhiên, trong trường hợp sấy ở nhiệt độ thấp kéo dài, các phản ứng enzyme và oxy hóa vẫn có thể tiếp diễn, dẫn đến suy giảm hoạt tính sinh học tương tự như sấy không khí nóng ở nhiệt độ thấp. Bên cạnh đó, do khả năng đâm xuyên hạn chế, hiệu quả của phương pháp này phụ thuộc nhiều vào kích thước và độ dày vật liệu [188].

Đối với sấy vi sóng (MWD), vi sóng truyền năng lượng trực tiếp vào bên trong vật liệu thông qua sóng điện từ (thường ở tần số 2.450 MHz), xuyên sâu vào vật liệu và làm nóng toàn bộ khối vật liệu từ trong ra ngoài (gia nhiệt thể tích). Dưới tác động của điện trường xoay chiều tần số cao, các phân tử lưỡng cực (chủ yếu là nước) và ion dao động mạnh, sinh nhiệt nhanh và đồng đều trong toàn bộ khối vật liệu. Sự gia nhiệt từ bên trong làm tăng nhanh áp suất nội bào, tạo chênh lệch áp suất giữa bên trong và bề mặt, từ đó thúc đẩy sự di chuyển ẩm từ trong ra ngoài. Đồng thời, áp suất này có thể gây phá vỡ cấu trúc tế bào, góp phần tăng tốc độ thoát ẩm và hỗ trợ giải phóng các hợp chất nội bào [235]. Tốc độ gia nhiệt nhanh giúp bất hoạt enzyme gần như tức thì và có thể góp phần bảo toàn hoạt chất [202]. Tuy nhiên, hiện tượng gia nhiệt không đồng đều hoặc quá mức có thể gây cháy cục bộ hoặc biến đổi mạnh cấu trúc hóa học [25, 107].

Trong khi đó, sấy lạnh (LAD) dựa trên sự đối lưu không khí khô có độ ẩm tương đối thấp (10-30%) và nhiệt độ thấp (35-60 °C), thường gọi là sấy bơm nhiệt. Không khí ẩm từ buồng sấy được dẫn qua dàn lạnh, tại đây hơi nước được ngưng tụ và loại bỏ, làm giảm độ ẩm của không khí. Sau đó, không khí khô được gia nhiệt tại dàn nóng đến nhiệt độ sấy thích hợp và tiếp tục tuần hoàn trở lại buồng sấy. Sấy lạnh giúp hạn chế biến đổi màu sắc và cấu trúc so với sấy nhiệt, nhưng tốc độ sấy chậm và thời gian kéo dài có thể ảnh hưởng đến sự ổn định vi sinh và hiệu quả xử lý [19].

Cuối cùng, sấy đông khô (FRD) diễn ra ở nhiệt độ thấp và áp suất thấp, trong đó nước được loại bỏ chủ yếu thông qua cơ chế thăng hoa từ trạng thái rắn sang hơi [31, 155]. Trong điều kiện chân không, nhiệt lượng được cung cấp nhằm phá vỡ cấu trúc tinh thể băng và duy trì quá trình thăng hoa, thay vì làm tăng nhiệt độ sản phẩm lên mức cao. Nhờ cơ chế này, cấu trúc xốp của vật liệu được bảo toàn, đồng thời hạn chế đáng kể các phản ứng phân hủy nhiệt và oxy hóa, giúp duy trì màu sắc và ổn định các hợp chất nhạy cảm. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi chi phí đầu tư và vận hành cao, thời gian sấy kéo dài, do đó còn hạn chế trong ứng dụng quy mô công nghiệp [82, 250].

Đối với các nguyên liệu thực vật giàu hoạt chất, các hợp chất phenolic là nhóm nhạy cảm với nhiệt và oxy, dễ bị oxy hóa, phân hủy hoặc polymer hóa trong quá trình sấy, dẫn đến suy giảm hoạt tính sinh học. Các hợp chất tanshinone thuộc nhóm diterpen quinone có cấu trúc chứa hệ vòng liên hợp và nhóm chức quinone, cũng dễ bị oxy hóa và biến đổi dưới tác động của nhiệt và oxy, đặc biệt trong điều kiện sấy nhiệt kéo dài, từ đó làm giảm hàm lượng và hoạt tính sinh học [144]. Ngược lại, các saponin steroid có độ bền nhiệt tương đối cao hơn so với phenolic và một số hợp chất nhạy cảm khác. Nhiều nghiên cứu thực nghiệm trên các dược liệu khác nhau cho thấy việc tăng nhiệt độ sấy (lên đến khoảng 80 °C) không những không làm suy giảm mà còn có thể làm tăng hàm lượng saponin tổng số trong bột thành phẩm [176, 197]. Tuy nhiên, khi nhiệt độ cao kéo dài hoặc trong môi trường có độ ẩm cao, các liên kết glycosidic vẫn có thể bị biến đổi ở mức độ nhất định. Do đó, việc kiểm soát chế độ nhiệt phù hợp là cần thiết nhằm hạn chế các biến đổi bất lợi, đồng thời khai thác đặc tính bền nhiệt tương đối của saponin để bảo toàn hoạt tính sinh học của sản phẩm.

Từ các cơ chế trên có thể thấy rằng, sự khác biệt về phương pháp sấy không chỉ ảnh hưởng đến động học tách ẩm mà còn quyết định mức độ biến đổi cấu trúc và khả năng bảo toàn hoạt chất, hoạt tính sinh học của nguyên liệu.

1.2.2. Các nghiên cứu về ảnh hưởng của phương pháp sấy đến chất lượng nguyên liệu

Trong thực tế, các phương pháp sấy khác nhau dẫn đến sự khác biệt đáng kể về chất lượng nguyên liệu khô, gồm các chỉ tiêu hóa lý (độ ẩm, hoạt độ nước, màu sắc, cấu trúc) và các chỉ tiêu dược học (hàm lượng hoạt chất và hoạt tính sinh học).

Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận xu hướng chung là sấy đông khô thường cho khả năng bảo toàn hoạt chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất do hạn chế tác động của nhiệt. Orphanides và cộng sự (2013) [184] cho thấy lá bạc hà sau khi sấy đông khô có hàm lượng phenolic tổng số và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất so với sấy đối lưu và sấy vi sóng, nhờ quá trình tách ẩm ở nhiệt độ thấp hạn chế phân hủy hợp chất nhạy nhiệt. Tương tự, Chen và cộng sự (2020) [51] khi nghiên cứu nhị hoa nghệ tây cũng ghi nhận phương pháp này giúp bảo toàn cấu trúc và màu sắc tốt nhất, mặc dù thời gian sấy kéo dài.

Bên cạnh đó, các phương pháp sấy bức xạ như vi sóng hoặc hồng ngoại cũng cho thấy ưu điểm rút ngắn thời gian sấy và giảm tổn thất hoạt chất. Tặng và cộng sự (2015) [176] khi khảo sát sấy *P. amarus* cho thấy sấy hồng ngoại 30 °C bảo toàn hoạt chất và

khả năng chống oxy hóa tốt hơn sấy đối lưu. Tương tự, Tặng và cộng sự (2016) [171] ghi nhận sấy vi sóng rễ Xáo tam phân (*P. trimera*) ở công suất 450 W giúp rút ngắn thời gian, tiết kiệm năng lượng, có hàm lượng hoạt chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với sấy truyền thống 25 °C, sấy khí nóng 100 °C hay sấy chân không 60 °C.

Tuy nhiên, kết quả giữa các nghiên cứu không hoàn toàn đồng nhất. Uribe và cộng sự (2020) [247] ghi nhận đối với rong nâu sấy đối lưu có thể duy trì hàm lượng vitamin và một số hoạt chất dinh dưỡng cao nhất, trong khi sấy đông khô lại ưu thế hơn về bảo toàn sắc tố. Ngược lại, các mẫu sấy hồng ngoại và phơi tự nhiên lại duy trì hàm lượng acid béo chưa bão hòa và acid amin thiết yếu cao hơn. Nghiên cứu sấy bạch chỉ [141] cũng ghi nhận rằng phơi trong bóng râm hoặc sấy ở 40 °C có thể cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với sấy đông khô.

Sự khác biệt này có thể được lý giải không chỉ bởi sự khác nhau về phương pháp sấy mà còn do đặc tính ban đầu của nguyên liệu, bao gồm thành phần hóa học, cấu trúc mô và trạng thái nguyên liệu. Do đó, cùng một phương pháp sấy có thể cho hiệu quả khác nhau tùy thuộc vào từng loại nguyên liệu.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của phương pháp sấy, phần lớn các công trình hiện nay chủ yếu dừng lại ở việc so sánh riêng lẻ các phương pháp và đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng, trong khi chưa làm rõ đầy đủ mối liên hệ giữa phương pháp sấy, biến đổi cấu trúc vi mô và khả năng bảo toàn hoạt chất sinh học. Đồng thời, các nghiên cứu còn thiếu sự liên kết giữa công đoạn sấy với các bước xử lý tiếp theo như chiết tách và ứng dụng.

Đối với ĐS, các nghiên cứu hiện chủ yếu dừng lại ở việc so sánh một số phương pháp làm khô truyền thống [303]. Đặc biệt, đối với BLMH, các nghiên cứu về ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến khả năng bảo toàn hoạt chất sinh học còn rất hạn chế. Trong thực tế sản xuất dược liệu tại Việt Nam, nguyên liệu sau thu hoạch vẫn chủ yếu được làm khô bằng phơi nắng, phơi trong bóng râm hoặc sử dụng các nguồn nhiệt đơn giản, thiếu kiểm soát về nhiệt độ, độ ẩm và thời gian. Quy trình xử lý thường chỉ dừng lại ở các bước cơ bản như rửa, cắt và phơi khô [12], chưa có các biện pháp kiểm soát nhằm hạn chế thất thoát các hợp chất nhạy cảm với nhiệt, ánh sáng và oxy.

Những hạn chế này cho thấy vẫn tồn tại khoảng trống nghiên cứu rõ rệt trong việc lựa chọn phương pháp sấy phù hợp, gắn với đánh giá ảnh hưởng đến thành phần hhoạt chất và hoạt tính sinh học của dược liệu, làm cơ sở cho các công đoạn xử lý và ứng dụng

tiếp theo. Việc lựa chọn phương pháp sấy phù hợp không chỉ góp phần bảo tồn hoạt chất mà còn tạo ra cấu trúc nguyên liệu sấy tối ưu, là tiền đề quan trọng cho quá trình chiết và vi bao đa cấu tử ở các giai đoạn sau.

1.3. Tổng quan về chiết tách hoạt chất sinh học từ nguyên liệu thực vật

1.3.1. Khái niệm về chiết tách

Chiết tách (trích ly) là công đoạn quan trọng nhằm thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu thực vật, dựa trên nguyên lý hòa tan chọn lọc các cấu tử mục tiêu trong dung môi thích hợp. Hiệu quả của quá trình chiết phụ thuộc đồng thời vào nhiều yếu tố như phương pháp chiết, loại dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ, thời gian và đặc tính hóa – lý của nguyên liệu [97].

1.3.2. Phương pháp chiết tách hoạt chất sinh học từ nguyên liệu thực vật

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc cải tiến các kỹ thuật chiết nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi và bảo toàn hoạt tính sinh học của hợp chất. Các phương pháp chiết truyền thống như ngâm chiết, sắc, Soxhlet tuy đơn giản và dễ thực hiện nhưng thường tiêu tốn nhiều thời gian, dung môi và dễ gây phân hủy các hợp chất nhạy nhiệt. Ngược lại, các kỹ thuật chiết hiện đại như chiết hỗ trợ siêu âm (UAE), chiết hỗ trợ vi sóng (MAE), chiết áp suất cao (PLE) hay enzyme (EAE) đã được chứng minh có khả năng tăng cường truyền khối, phá vỡ cấu trúc tế bào và rút ngắn thời gian chiết, từ đó nâng cao hiệu suất thu hồi hoạt chất [30].

Chiết hỗ trợ vi sóng (MAE) hoạt động dựa trên tương tác trực tiếp của bức xạ điện từ lên các phân tử phân cực (như nước trong tế bào nguyên liệu và dung môi). Dưới tác động của vi sóng, các phân tử này dao động mạnh theo cơ chế quay lưỡng cực và dẫn truyền ion, tạo nhiệt nhanh trong toàn bộ khối mẫu. Nhờ đó, áp suất nội bào tăng lên, thành tế bào bị phá vỡ, tạo điều kiện cho dung môi thâm nhập tốt hơn và hòa tan các chất mục tiêu hiệu quả hơn, qua đó rút ngắn thời gian chiết và giảm lượng dung môi sử dụng. Tuy nhiên, sự gia nhiệt nhanh cũng có thể gây biến đổi hoặc phân hủy các hợp chất nhạy nhiệt nếu không kiểm soát tốt điều kiện chiết [246].

Chiết hỗ trợ siêu âm (UAE) dựa trên hiện tượng tạo và sụp vỡ bọt khí trong môi trường lỏng. Sóng siêu âm tạo ra các vi bọt khí, khi các bọt khí này hình thành, phát triển và sụp vỡ, chúng sinh ra áp suất và nhiệt độ cục bộ rất cao, góp phần phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng khả năng thấm dung môi và thúc đẩy giải phóng các hoạt chất vào dịch

chiết. Nhờ đó, UAE có thể nâng cao hiệu quả chiết và rút ngắn thời gian xử lý. Tuy nhiên, ở cường độ siêu âm quá cao hoặc thời gian xử lý kéo dài, quá trình này có thể tạo ra các gốc tự do như •OH, •H, làm gia tăng nguy cơ oxy hóa và suy giảm độ bền của một số hợp chất nhạy cảm [130].

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết tách

Các yếu tố công nghệ trong quá trình chiết không tác động riêng lẻ mà có sự tương tác lẫn nhau, do đó cần được xem xét đồng thời trong quá trình tối ưu hóa.

1.3.3.1. Dung môi

Dung môi là yếu tố then chốt quyết định hiệu quả chiết tách do ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng hòa tan và tính chọn lọc đối với các hợp chất sinh học. Việc lựa chọn dung môi phù hợp cần dựa trên độ phân cực (yếu tố quyết định các lực tương tác liên phân tử như liên kết hydro, tương tác lưỡng cực; dung môi có độ phân cực tương đồng với hoạt chất sẽ tạo ra năng lượng hòa tan đủ lớn để thắng lực liên kết trong cấu trúc mẫu, giúp "kéo" hoạt chất ra ngoài), hằng số điện môi (yếu tố phản ánh khả năng giảm lực hút tĩnh điện giữa các phân tử, dung môi có hằng số điện môi cao làm yếu đi lực hút tĩnh điện giữa các phân tử hoạt chất, giúp chúng dễ dàng tách rời và hòa tan tốt hơn), khả năng tương tác với chất tan, tính an toàn, chi phí và khả năng thu hồi… [30]. Trong chiết xuất dược liệu, một số dung môi phổ biến bao gồm [19]:

Nước là dung môi phổ biến, an toàn, chi phí thấp và thân thiện môi trường. Nước có độ nhớt thấp, sức căng bề mặt tương đối cao, độ phân cực rất mạnh (9,0) và hằng số điện môi lớn (78,5 ở 25ºC), do đó có khả năng thấm ướt và khuếch tán vào nguyên liệu, đồng thời hòa tan hiệu quả các hợp chất phân cực như saponin, phenolic. Tuy nhiên, nước kém hiệu quả trong việc chiết các hợp chất ít phân cực. Ngoài ra, nhiệt độ sôi cao có thể làm suy giảm hoặc phân hủy một số hoạt chất nhạy nhiệt trong quá trình chiết.

Methanol (CH_3OH) là dung môi không màu, dễ bay hơi, có khả năng hòa tan tốt nhiều hợp chất hữu cơ và một số hợp chất vô cơ. Methanol có độ phân cực mạnh (5,1) và hằng số điện môi tương đối cao (32,6 ở 25ºC) và hoàn toàn tan trong nước, do đó thích hợp để chiết các hợp chất phân cực. Nhờ điểm sôi thấp (64,7 °C), methanol cho phép thực hiện quá trình chiết ở nhiệt độ thấp, góp phần hạn chế phân hủy các hoạt chất nhạy với nhiệt. Tuy nhiên, do độc tính cao, dung môi này cần được loại bỏ hoàn toàn trước khi ứng dụng trong thực phẩm hay dược phẩm.

Ethanol (C_2H_5OH) là dung môi không màu, trong suốt, có mùi thơm dễ chịu và tan vô hạn trong nước. Ethanol có độ phân cực mạnh (5,2) và hằng số điện môi trung bình (24,3 ở 25 °C), do đó có khả năng hòa tan được phổ rộng các hợp chất từ phân cực đến ít phân cực, như flavonoid, glycoside, tanin, alkaloid và triterpenoid. Nhờ vậy, ethanol thường được sử dụng dưới dạng hỗn hợp ethanol–nước để điều chỉnh độ phân cực của dung môi, tối ưu hóa hiệu suất chiết các hợp chất sinh học. Tuy nhiên, ethanol có tính dễ bay hơi và dễ cháy, đồng thời kém hiệu quả đối với các hợp chất quá phân cực hoặc không phân cực.

Aceton (CH_3COCH_3) là dung môi hữu cơ không màu, dễ bay hơi, có khả năng hòa tan tốt trong nước và nhiều dung môi hữu cơ khác. Aceton có độ phân cực mạnh (5,2) và hằng số điện môi trung bình (20,7 ở 25 °C), do đó thích hợp để hòa tan các hợp chất hữu cơ có độ phân cực trung bình đến thấp, như một số hợp chất phenolic ít phân cực và terpenoid. Tuy nhiên, do có tính dễ bay hơi, dễ cháy và mùi đặc trưng, dung môi này cần được loại bỏ hoàn toàn trước khi ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm hoặc dược phẩm.

Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$) là dung môi hữu cơ có độ phân cực khá yếu (4,4) và hằng số điện môi tương đối nhỏ (6,0 ở 25 °C). Dung môi này thường được sử dụng để tách các hợp chất có độ phân cực trung bình đến thấp, như như alkaloid, flavonoid ít phân cực, coumarin, triterpenoid và steroid. Dung môi này có tính dễ bay hơi, có mùi dễ chịu và độc tính thấp hơn so với methanol và aceton, do đó được sử dụng phổ biến trong các quy trình chiết tách và phân đoạn hợp chất tự nhiên.

Chloroform ($CHCl_3$) là dung môi có độ phân cực khá yếu (4,1) và hằng số điện môi nhỏ (4,8 ở 25 °C), thường được sử dụng rộng rãi để chiết các hợp chất không phân cực hoặc rất ít phân cực như lipid, sterol và một số terpenoid. Tuy nhiên, do độc tính cao (gây ảnh hưởng đến gan, thận và có khả năng gây ung thư khi tiếp xúc kéo dài) cùng với các vấn đề về an toàn và môi trường, việc sử dụng chloroform hiện nay bị hạn chế, chủ yếu chỉ được sử dụng có chọn lọc trong nghiên cứu hóa học hoặc phân tích khi không có lựa chọn thay thế an toàn hơn.

Xét dưới góc độ định hướng phát triển thực phẩm chức năng, ethanol và nước được ưu tiên xem xét như những dung môi mục tiêu "xanh" do tính thân thiện với môi trường và đáp ứng tiêu chuẩn an toàn thực phẩm. Các dung môi hữu cơ khác (như methanol, chloroform) đóng vai trò là các đối chứng về khả năng trích ly, giúp làm rõ bản chất hóa lý của hoạt chất trong nguyên liệu trước khi lựa chọn quy trình công nghệ cuối cùng.

1.3.3.2. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có thể thay đổi tùy thuộc vào tính chất của mẫu cần chiết, mục tiêu, hiệu suất chiết và yêu cầu phân tích cụ thể. Nếu tỷ lệ nguyên liệu không phù hợp, có thể xảy ra hiện tượng kết tủa, làm giảm hiệu suất chiết và làm mất tính đồng đều của quá trình. Trong một số trường hợp, tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có thể làm tăng hiệu suất chiết do cung cấp nhiều chất cần tách hơn để hòa tan trong dung môi. Tuy nhiên, nhiều nguyên liệu quá có thể làm giảm hiệu suất chiết và gây lãng phí. Bên cạnh đó, cũng có thể ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của chất cần tách trong dung môi.

1.3.3.3. Thời gian chiết

Thời gian chiết quá ngắn có thể không đạt được sự hòa tan và di chuyển đầy đủ của chất cần chiết, làm giảm hiệu suất chiết. Ngược lại, chiết quá lâu có thể tạo ra sự phá vỡ các tế bào trong nguyên liệu hoặc biến đổi không mong muốn, tốn năng lượng…

1.3.3.4. Thời gian bức xạ

Trong chiết MAE, thời gian bức xạ càng dài, nhiệt tích lũy sẽ càng cao, có thể gây nóng cục bộ, hàm lượng một số hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa có trong cây dược liệu bị ảnh hưởng, các chất không mong muốn đi vào dịch chiết, trương nở mẫu nguyên liệu… Ngoài ra, thực hiện quá trình chiết không an toàn. Ngược lại, nếu thời gian bức xạ quá ngắn, bức xạ vi sóng chưa kịp tiếp xúc với mẫu, sẽ không chiết được hoàn toàn các hoạt chất sinh học trong nguyên liệu.

1.3.3.5. Công suất vi sóng

Trong chiết MAE, công suất quá cao làm nhiệt độ tăng cao, dễ phân hủy các hoạt chất sinh học trong nguyên liệu. Ngược lại, công suất thấp dẫn đến không đủ nhiệt để chiết hoàn toàn các hoạt chất cần thiết có trong cây, hiệu suất thu hồi dịch chiết kém.

1.3.4. Nghiên cứu về tách chiết rễ ĐS và BLMH

1.3.4.1. Các nghiên cứu về chiết tách rễ ĐS

Việc thu hồi các nhóm hoạt chất chính trong ĐS như acid phenolic và tanshinone là mục tiêu trọng tâm của nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới với các công nghệ tiên tiến.

Các kỹ thuật như chiết lỏng siêu tới hạn (SFE – CO_2) kết hợp 10% methanol làm đồng dung môi [65], chiết tách bằng nước cận tới hạn [122], chiết tách lỏng áp suất cao (PLE) [183] và chiết hỗ trợ vi sóng (MAE) [186] đã chứng minh hiệu suất thu hồi

tanshinone và acid phenolic vượt trội so với các phương pháp truyền thống. Các công nghệ này cho phép rút ngắn thời gian xử lý và bảo tồn tối đa hoạt tính của các cấu tử nhạy cảm nhiệt.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về chiết tách ĐS vẫn còn khá hạn chế, chủ yếu tập trung vào việc xác định thành phần và hàm lượng hơn là xây dựng quy trình công nghệ tối ưu. Điển hình là các công trình ứng dụng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC-DAD) để phân tách, xác định hàm lượng tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone IIA [13] hoặc sử dụng nhựa hấp phụ macroporous để làm giàu nhóm tanshinone từ cao chiết [18].

1.3.4.2. Các nghiên cứu về tách chiết thân rễ BLMH

Kỹ thuật chiết tách áp suất siêu cao (UHPE) [295] được chứng minh là vượt trội hơn hẳn so với Soxhlet, UAE hay MAE. Bản chất của sự vượt trội này nằm ở khả năng nén của áp suất cao, thúc đẩy dung môi thẩm thấu tức thì vào các mô đặc khít của thân rễ, giúp rút ngắn thời gian xử lý mà vẫn đạt hiệu suất saponin tối đa.

Các khảo sát chiết chiết thân rễ BLMH bằng nhiều loại dung môi (nước, methanol, ethanol, ethyl acetate, chloroform) [193] đã xác định được sự hiện diện phong phú của saponin, flavonoid, terpenoid và sterol. Điều này củng cố tính thực tiễn của việc sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau để thăm dò toàn diện kho hoạt chất của cây.

Ngoài ra, nghiên cứu của Shen và cộng sự (2014) [222] về việc chiết polysaccharide từ lá BLMH đã chỉ ra khả năng chống oxy hóa mạnh của bộ phận này, chứng tỏ đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng bên cạnh thân rễ truyền thống.

Các nghiên cứu tại Việt Nam về BLMH vẫn còn tương đối hạn chế và chưa đồng đều. Phần lớn các công trình công bố hiện nay chủ yếu tập trung vào khảo sát thành phần hóa học hoặc đánh giá hoạt tính sinh học ở mức định tính hoặc bước đầu, trong khi các nghiên cứu theo hướng công nghệ, đặc biệt là tối ưu hóa các thông số chiết tách (như nồng độ dung môi, nhiệt độ, thời gian) nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi và hoạt tính sinh học còn chưa được quan tâm đầy đủ.

Tóm lại, từ các nghiên cứu đã công bố có thể thấy rằng, mặc dù nhiều phương pháp chiết tách đã được áp dụng cho ĐS và BLMH, các kết quả còn phân tán và chủ yếu tập trung vào khảo sát riêng lẻ từng yếu tố hoặc từng phương pháp cụ thể. Việc tối ưu hóa đồng thời các điều kiện chiết nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi và hoạt tính sinh học, đặc biệt có xét đến sự khác biệt về bản chất nguyên liệu, vẫn chưa được nghiên cứu một

cách hệ thống. Bên cạnh đó, các nghiên cứu áp dụng các phương pháp tối ưu hóa thực nghiệm trong chiết tách đối với hai loại nguyên liệu này còn hạn chế. Do đó, việc nghiên cứu theo hướng lựa chọn dung môi, so sánh phương pháp chiết và tối ưu hóa điều kiện chiết ở quy mô phòng thí nghiệm là cần thiết, nhằm làm rõ cơ sở khoa học và làm nền tảng cho việc xây dựng quy trình chiết tách phù hợp cho từng loại nguyên liệu trong luận án này

1.4. Tổng quan về công nghệ vi bao chiết xuất từ thực vật

1.4.1. Khái niệm và mục đích của vi bao trong công nghệ thực phẩm

Công nghệ vi bao (microencapsulation) trong những năm gần đây đã trở thành một giải pháp then chốt trong công nghệ thực phẩm nhằm bảo vệ và nâng cao giá trị sử dụng của các hợp chất có hoạt tính sinh học nhạy cảm. Về bản chất, đây là quá trình bao gói các hoạt chất mục tiêu (lõi) vào bên trong một ma trận vật liệu bảo vệ (vỏ) có kích thước micro, nhằm ngăn cách chúng khỏi các tác động bất lợi từ môi trường như ánh sáng, nhiệt độ và oxy hóa [287].

Các cơ chế bảo vệ chính của vi bao có thể được tóm tắt như sau:

- Tạo rào cản cách ly vật lý và cô lập cơ học: Lớp bao màng hình thành một màng ngăn cách vật lý rắn chắc, kín khít bao quanh lõi, giúp bảo vệ các chất nhạy cảm khỏi sự tấn công trực tiếp của oxy, ánh sáng và độ ẩm từ môi trường bên ngoài [86]

- Hạn chế sự khuếch tán: Cấu trúc ma trận phức tạp và độ nhớt cao của vật liệu bao (ví dụ Gum Arabic) giúp giữ lại hoạt chất trong lòng vi hạt, hạn chế sự di chuyển ra bề mặt và giảm nguy cơ phân hủy sớm [22].

- Ngăn chặn các phản ứng hóa học và sinh hóa: chống oxy hóa, ổn định nhiệt, hạn chế thủy phân [242]

- Ổn định cấu trúc ma trận: Maltodextrin góp phần nâng cao nhiệt độ chuyển thủy tinh, giảm hiện tượng dính bám và nứt vỡ trong quá trình sấy và bảo quản, từ đó duy trì tính toàn vẹn của hệ vi bao [288]

- Bảo vệ trong môi trường tiêu hóa: Hệ vi bao giúp hạn chế sự phân hủy hoạt chất trong môi trường acid của dạ dày, đồng thời cho phép giải phóng có kiểm soát tại các vị trí mục tiêu trong đường ruột [22]

- Ổn định hệ keo: Vật liệu bao tạo ra lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt (thể hiện qua thế zeta âm), giúp hạn chế hiện tượng kết tụ, lắng đọng và nâng cao độ ổn định của hệ phân tán [244].

Tuy nhiên, hiệu quả bảo vệ phụ thuộc đáng kể vào đặc điểm cấu trúc của từng nhóm hợp chất sinh học. Các hợp chất phenolic dễ bị oxy hóa do chứa nhiều nhóm hydroxyl nên việc vi bao giúp hạn chế tiếp xúc với oxy và ánh sáng. Tanshinone trong ĐS, thuộc nhóm diterpen quinone, nhạy với ánh sáng và quá trình oxy hóa, do đó lớp bao polymer có vai trò làm giảm sự phân hủy. Trong khi đó, saponin steroid của BLMH tương đối bền nhiệt nhưng có thể bị biến đổi trong môi trường phân cực, vì vậy vi bao góp phần ổn định môi trường vi mô và hạn chế thất thoát trong quá trình sấy.

1.4.2. Các chất bao màng trong vi bao chiết xuất từ thực vật

Chất bao màng là yếu tố quyết định hiệu quả của quá trình vi bao, do ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất bao, độ ổn định, khả năng hòa tan và kiểm soát giải phóng hoạt chất. Dựa trên bản chất hóa học, các chất bao màng thường được phân thành ba nhóm chính gồm carbohydrate, protein và các polymer tự nhiên hoặc biến tính [224]. Trong đó, các polysaccharide như maltodextrin (MD), gum arabic (GA), tinh bột biến tính (MCS) và pectin (PEC) được sử dụng phổ biến nhờ tính an toàn, khả năng hòa tan cao và khả năng tạo màng tốt.

MD thường được sử dụng như chất mang chính do khả năng tạo ma trận vô định hình nhanh, góp phần hạn chế hiện tượng dính và giảm quá trình oxy hóa, tuy nhiên lại có khả năng nhũ hóa hạn chế [174]. Ngược lại, GA là poymer lưỡng cực, trong đó các đoạn polypeptide gắn trên mạch polysaccharide đóng vai trò như chất nhũ hóa tự nhiên, hệ nhũ tương chứa các hợp chất kém phân cực trước khi sấy [231]. Bên cạnh đó, việc bổ sung MCS [41] hoặc PEC [179] giúp gia cố mạng lưới polymer thông qua các tương tác tĩnh điện và liên kết hydro, từ đó hình thành cấu trúc màng bao chặt chẽ hơn, giảm tính thấm khí và nâng cao độ bền cơ học của hạt vi bao.

Việc phối hợp các chất bao trong hệ đa cấu tử cho phép phát huy ưu điểm của từng thành phần, tạo hiệu ứng hiệp đồng trong việc nâng cao năng suất bao màng, giảm tổn thất hoạt chất và cải thiện độ ổn định trong quá trình bảo quản [41, 224, 287]. Các tương tác trong hệ vi bao có thể chia thành hai nhóm chính:

*** Giữa các chất bao màng**

- Tương tác tĩnh điện: Các polymer mang điện tích trái dấu hút nhau, tạo thành phức hợp không hòa tan bao quanh lõi. Ví dụ, sự kết hợp giữa gelatin (tích điện dương) và gum arabic hoặc alginate (tích điện âm) trong các điều kiện pH thích hợp [58, 244]

- Cấu trúc "Hộp trứng": Cơ chế đặc trưng của pectin hoặc alginate khi tương tác với các ion hóa trị hai (thường là Ca^{2+}). Các ion này đóng vai trò như "cầu nối" giữa các nhóm carboxylate trên các chuỗi polymer lân cận, hình thành mạng lưới gel bền vững [58].

- Tương tác hiệp đồng giữa các loại chất bao màng: Việc phối trộn nhiều loại polymer giúp tận dụng ưu điểm của từng thành phần, từ đó cải thiện tính chất cơ học và khả năng tạo màng. Ví dụ, MD giúp tăng hàm lượng chất khô và độ hòa tan, trong khi GA hoặc MCS cung cấp khả năng nhũ hóa và tạo màng ổn định [41].

*** Giữa chất bao màng và hoạt chất bên trong:** Các hợp chất sinh học có thể được giữ lại trong hệ vi bao thông qua một số cơ chế như:

- Tương tác kỵ nước: Các polymer lưỡng tính (như gum arabic hoặc tinh bột biến tính) có xu hướng định hướng phần kỵ nước vào bên trong để tương tác với các hợp chất kém phân cực, đồng thời phần ưa nước hướng ra ngoài giúp ổn định hệ phân tán [157]. Ví dụ, tinh bột biến tính có thể tương tác kỵ nước với các vòng thơm của hợp chất phenolic [17].

- Liên kết vật lý và hóa học bề mặt: Hoạt chất có thể liên kết với chất bao thông qua liên kết hydro, lực Van der Waals hoặc bị giữ lại cơ học trong các lỗ rỗng của cấu trúc ma trận polymer sau khi sấy [66]. Ví dụ, pectin tương tác với phenolic thông qua liên kết hydro và tương tác tĩnh điện [17].

- Tạo phức hợp: các hoạt chất có thể được giữ lại dưới dạng "phức hợp bao gồm", trong đó phân tử hoạt chất (như phenolic hoặc các hợp chất kém phân cực) được "nhốt" bên trong cấu trúc xoắn của polymer (ví dụ amylose, cyclodextrin), hoặc dưới dạng "phức hợp không bao gồm", khi hoạt chất được hấp phụ trên bề mặt hoặc bị giữ trong mạng lưới ma trận polymer [66].

Do đó, trong luận án này, hệ chất bao đa cấu tử được lựa chọn thay cho các polymer đơn lẻ nhằm tối ưu hóa khả năng bảo vệ và duy trì hoạt tính sinh học của dịch chiết. Đồng thời, việc kế thừa và phân tích các thông số kỹ thuật từ các nghiên cứu tiền đề đã cung cấp cơ sở khoa học để xác định khoảng biến thiên và lựa chọn tỷ lệ phối hợp chất bao phù hợp với nguyên liệu nghiên cứu.

1.4.3. Các phương pháp vi bao

Hiện nay, nhiều công nghệ vi bao đã được phát triển nhằm tạo ra các hệ hạt có kích thước và tính chất phù hợp với mục đích bảo vệ và kiểm soát giải phóng hoạt chất [287]. Các phương pháp vi bao thường được phân loại dựa trên cơ chế hình thành lớp màng bao quanh nhân, bao gồm các nhóm chính như phương pháp sấy (sấy phun, sấy đông khô, sấy chân không), phương pháp hóa học (trùng hợp tại chỗ, tạo liposome) và các phương pháp vật lý – hóa học (đồng kết tủa/coacervation, đùn tạo cầu ion).

Mỗi kỹ thuật có những đặc điểm và phạm vi ứng dụng riêng. Sấy phun là phương pháp được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực thực phẩm và dược liệu nhờ khả năng tạo hạt có kích thước đồng đều, năng suất cao và chi phí hợp lý. Tuy nhiên, quá trình tiếp xúc với dòng khí nóng có thể ảnh hưởng đến một số hợp chất nhạy nhiệt. Ngược lại, sấy đông khô cho khả năng bảo tồn hoạt tính tốt hơn do thực hiện ở nhiệt độ thấp và môi trường chân không, nhưng hạn chế về chi phí và thời gian xử lý. Các phương pháp như đùn tạo cầu ion hoặc đồng kết tủa thường được áp dụng cho các hệ polymer đặc thù, cho phép kiểm soát cấu trúc hạt tốt nhưng khó mở rộng quy mô.

Việc lựa chọn phương pháp vi bao phụ thuộc chặt chẽ vào đặc tính của hoạt chất và mục tiêu ứng dụng. Đối với dịch chiết từ ĐS và BLMH, các hợp chất như tanshinone, phenolic và saponin steroid có mức độ nhạy cảm khác nhau đối với nhiệt độ và oxy. Trong đó, các hợp chất phenolic và tanshinone dễ bị oxy hóa hoặc phân hủy khi tiếp xúc với nhiệt độ cao và oxy, trong khi saponin tương đối bền hơn nhưng vẫn có thể bị biến đổi trong điều kiện xử lý không phù hợp.

Trong luận án này, phương pháp sấy chân không được lựa chọn nhằm tạo hệ vi bao trong điều kiện nhiệt độ thấp và môi trường áp suất giảm, qua đó hạn chế sự tiếp xúc với oxy và giảm thiểu biến đổi bất lợi của hoạt chất. Mặc dù thời gian xử lý có thể kéo dài hơn so với một số phương pháp khác, sấy chân không cho phép duy trì tốt hơn cấu trúc và hoạt tính sinh học của dịch chiết. Do đó, phương pháp này được xem là phù hợp với định hướng bảo tồn hoạt chất trong hệ vi bao từ ĐS và BLMH ở quy mô phòng thí nghiệm.

1.4.4. Các chỉ tiêu đánh giá bột vi bao

Trong các nghiên cứu về hệ vi bao, những chỉ tiêu như hiệu suất bao (encapsulation efficiency), hiệu suất tải hoạt chất (loading capacity) và độ ổn định theo thời gian thường

được ưu tiên xác định nhằm phản ánh trực tiếp khả năng lưu giữ cũng như mức độ bảo vệ hoạt chất của mạng lưới polyme. Tuy nhiên, do giới hạn về mục tiêu tập trung vào việc khảo sát sự tương thích của các tổ hợp vật liệu bao mới trên nền hợp chất nhạy cảm nhiệt, các thông số kỹ thuật nêu trên chưa được thực hiện đo đạc trực tiếp trong nghiên cứu này. Thay vào đó, chất lượng của hệ vi bao được tập trung chứng minh thông qua hệ thống các chỉ tiêu thực chứng gồm: năng suất bao màng, tính chất hóa lý, hoạt tính sinh học và đặc trưng cấu trúc bề mặt…

Các chỉ tiêu vật lý, hóa lý như độ ẩm, hoạt độ nước (a_w) và khả năng hòa tan có vai trò quan trọng trong việc đánh giá độ ổn định và khả năng ứng dụng của sản phẩm, trong đó độ ẩm thấp và hoạt độ nước phù hợp góp phần hạn chế sự phát triển của vi sinh vật và các phản ứng phân hủy.

Song song đó, các chỉ tiêu hóa học như hàm lượng polyphenol tổng (TPC), saponin tổng (TSC) cùng với các phép thử hoạt tính chống oxy hóa (FRAP, DPPH, ABTS) được sử dụng để đánh giá khả năng bảo lưu hợp chất sinh học và duy trì hoạt tính sau quá trình vi bao cũng như trong quá trình bảo quản.

Các chỉ tiêu an toàn được xem xét thông qua việc xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, nấm men – nấm mốc và các vi khuẩn gây bệnh như *Coliforms*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Clostridium perfringens*, cùng với hàm lượng kim loại nặng (Pb, Cd, As, Hg), nhằm đảm bảo sản phẩm đáp ứng yêu cầu về an toàn thực phẩm.

Ngoài ra, hoạt tính sinh học mở rộng của hệ vi bao được đánh giá thông qua khả năng kháng vi sinh vật và ức chế tế bào ung thư *in vitro*. Hoạt tính kháng vi sinh vật được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa hoặc xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên các chủng vi sinh vật đại diện, trong khi hoạt tính ức chế tế bào được khảo sát trên một số dòng tế bào ung thư và tế bào đối chứng nhằm xác định khả năng ức chế tăng sinh tế bào và giá trị GI_{50}. Các kết quả này cho phép đánh giá sơ bộ tiềm năng sinh học của sản phẩm vi bao, đồng thời cần được xem xét trong giới hạn của thử nghiệm *in vitro.*

1.4.5. Các nghiên cứu thực nghiệm về hệ vi bao đa cấu tử

Hiệu quả của công nghệ vi bao trong việc bảo tồn các hợp chất nhạy cảm đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu thực nghiệm, với xu hướng chuyển dịch từ việc sử dụng polymer đơn lẻ sang các hệ chất bao đa thành phần. Các nghiên cứu cho thấy việc

tối ưu hóa tỷ lệ chất bao, tỷ lệ nhân/bao và điều kiện sấy có ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất bao màng, cấu trúc hạt và khả năng bảo lưu hoạt chất.

Tại Việt Nam, các hệ chất bao kết hợp giữa maltodextrin (MD) và gum arabic (GA) hoặc các polymer khác đã được ứng dụng để bảo vệ nhiều nhóm hoạt chất tự nhiên. Nghiên cứu của Tran và cộng sự (2021) [174] trên dịch chiết vỏ quả ca cao cho thấy hệ MD:GA (8:2) có khả năng tạo màng bao ổn định và duy trì hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn so với việc sử dụng đơn lẻ từng polymer. Tương tự, việc phối hợp MD với cyclodextrin (CD) đã được chứng minh có hiệu quả trong việc ổn định asiaticoside từ rau má và cải thiện khả năng bảo quản của sản phẩm [16]. Gần đây, nghiên cứu của Nguyễn Văn Tặng và cộng sự (2024) [17] cho thấy sự kết hợp giữa tinh bột biến tính (MCS) và pectin (PEC) không chỉ cải thiện cấu trúc màng bao mà còn góp phần duy trì hoạt tính sinh học, chẳng hạn như khả năng ức chế enzyme.

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu cũng tập trung vào việc nâng cao độ bền màng và hiệu quả bảo vệ hoạt chất thông qua các hệ chất bao đa cấu tử. Tolun và cộng sự (2016) [242] khi nghiên cứu vi bao polyphenol từ bã nho bằng sấy phun đã ghi nhận hiệu quả bảo vệ cao của hệ MD:GA. Ngoài ra, các hệ ba thành phần như MD–GA–MCS cũng được báo cáo có khả năng cải thiện đáng kể độ hòa tan và tính ổn định của các hợp chất kém tan như curcumin [43]. Những kết quả này cho thấy việc phối hợp các polymer có tính chất bổ trợ là hướng tiếp cận hiệu quả để nâng cao chất lượng sản phẩm vi bao.

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy mỗi loại vật liệu bao có vai trò riêng trong hệ vi bao đa cấu tử. MD đóng vai trò chất nền tạo màng, GA hỗ trợ khả năng nhũ hóa, trong khi MCS và PEC góp phần gia cố cấu trúc và giảm tính thấm ẩm. Tuy nhiên, các nghiên cứu khảo sát sự phối hợp đồng thời của hệ bốn thành phần MD–GA–MCS–PEC vẫn còn hạn chế. Đối với hệ dịch chiết phối hợp như ĐS và BLMH, vốn chứa các nhóm hoạt chất có tính chất khác nhau như tanshinone, phenolic và saponin steroid, việc lựa chọn hệ chất bao đa cấu tử phù hợp là cần thiết nhằm tận dụng tính bổ trợ giữa các polymer, từ đó nâng cao hiệu quả bảo vệ hoạt chất và độ ổn định của sản phẩm.

1.5. Tổng quan về hoạt tính và đánh giá hoạt tính sinh học

Trong luận án này, việc đánh giá hoạt tính tập trung vào ba nhóm chính: khả năng chống oxy hóa, kháng vi sinh vật và ức chế tế bào ung thư *in vitro*.

1.5.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Oxy hóa là quá trình mất electron của một phân tử hoặc nguyên tử, có thể diễn ra theo nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm cả cơ chế có hoặc không có sự tham gia của gốc tự do. Trong đó, gốc tự do là các phân tử hoặc nguyên tử có electron độc thân, có khả năng phản ứng cao và thường tham gia vào các phản ứng oxy hóa theo chuỗi, gây biến đổi lipid, protein và các hợp chất sinh học khác trong hệ thống sinh học cũng như trong thực phẩm. Khi sự hình thành và tích lũy các gốc tự do vượt quá khả năng kiểm soát của hệ thống chống oxy hóa nội sinh, trạng thái mất cân bằng oxy hóa (stress oxy hóa) có thể xảy ra, ảnh hưởng đến chất lượng thực phẩm và sức khỏe con người [88].

Chất chống oxy hóa có khả năng cho electron hoặc nguyên tử hydro để trung hòa gốc tự do, từ đó làm gián đoạn chuỗi phản ứng oxy hóa. Trong nguyên liệu thực vật, các hợp chất như polyphenol, flavonoid và saponin được ghi nhận có đóng góp quan trọng vào hoạt tính chống oxy hóa [159].

Do tồn tại nhiều cơ chế chống oxy hóa (cho electron, cho hydro, khử kim loại), các phương pháp đánh giá thường được kết hợp để phản ánh toàn diện hoạt tính của dịch chiết. Cụ thể khả năng khử gốc tự do DPPH và ABTS (DRSC và ARSC) đánh giá khả năng nhường hydro/electron, trong khi khả năng khử sắt (FRAP) phản ánh năng lực khử thông qua chuyển Fe^{3+} thành Fe^{2+}.

Nhiều nghiên cứu đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thực vật bằng các phương pháp *in vitro*. Pham và cộng sự (2016) [195] cho thấy dịch chiết *P. amarus* thu được bằng phương pháp chiết hỗ trợ vi sóng trong nước thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với các phương pháp chiết khác. Tương tự, dịch chiết methanol từ các loài Diệp hạ châu cũng được ghi nhận có khả năng bắt gốc tự do mạnh [131]. Ngoài ra, các nghiên cứu của Nguyen và cộng sự trên *Paramignya trimera* và *Phyllanthus amarus* [171-173, 176] cho thấy dịch chiết không chỉ có hoạt tính chống oxy hóa cao mà còn có tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Tóm lại, hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc đáng kể vào phương pháp chiết và dung môi sử dụng, trong đó các phương pháp chiết hiện đại thường cho hiệu quả thu hồi hoạt chất cao hơn.

1.5.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật in vitro

Trong bối cảnh gia tăng hiện tượng kháng kháng sinh, việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên từ thực vật với khả năng ức chế vi sinh vật đang được quan tâm. Dịch chiết thực vật chứa nhiều hợp chất sinh học như phenolic, flavonoid và saponin có thể tác động đến màng tế bào, enzyme hoặc hệ thống trao đổi chất của vi sinh vật. Tuy nhiên, hoạt tính kháng vi sinh vật phụ thuộc vào bản chất hợp chất, nồng độ và đối tượng vi sinh vật, và không phải tất cả các hợp chất từ thực vật đều an toàn đối với tế bào sống [181].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro* thường bao gồm phương pháp khuếch tán đĩa thạch để sàng lọc nhanh hoạt tính và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) [32]. Các phương pháp này chủ yếu được sử dụng cho mục đích sàng lọc ban đầu và so sánh tương đối khả năng ức chế vi sinh vật của các mẫu thử.

Nhiều nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của dịch chiết thực vật bằng các phương pháp *in vitro*. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của các chất chiết xuất *Cassia Fistula* đã cho thấy sự ức chế đáng kể sự phát triển của vi khuẩn thử nghiệm *S. aureus, S. pyogenes, E. coli, P. aeruginosa* và ba chủng nấm *A. niger, A.clavatus, C.* [34]. Sapkota và cộng sự [213] nghiên cứu khả năng kháng vi sinh vật của lá ổi, tỏi, gừng đối với các tác nhân vi sinh vật gây bệnh cho con người đã cho thấy gừng có hiệu quả kháng khuẩn đối với *S. aureus*, còn lá ổi và tỏi đều có tác dụng đối với các vi sinh vật nghiên cứu (*B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aboni*). Mostafa và cộng sự [160] cho thấy cả 5 loại nguyên liệu (thì là, đinh hương, xạ hương, lựu, gừng) đều có khả năng kháng vi sinh vật đối với *B. cereus, S. aureus, E. coli, S. typhi, P. aeruginosa.*

1.5.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư in vitro

Ung thư là kết quả của sự tích lũy các đột biến trong DNA, dẫn đến rối loạn quá trình kiểm soát tăng trưởng và phân chia tế bào. Các tế bào ung thư có khả năng tăng sinh không kiểm soát và kéo dài thời gian sống so với tế bào bình thường. Tuy nhiên, trong phạm vi nghiên cứu in vitro, các thử nghiệm chủ yếu tập trung vào đánh giá phản ứng của tế bào đối với tác nhân thử nghiệm hơn là đi sâu vào cơ chế bệnh học.

Đánh giá hoạt tính kháng ung thư *in vitro* thường bao gồm: (i) xác định khả năng ức chế tăng trưởng và sống sót của tế bào; (ii) khảo sát một số cơ chế gây chết tế bào; và (iii) phân tích ảnh hưởng đến chu trình tế bào hoặc stress oxy hóa [148]. Trong đó, đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào là một trong những chỉ tiêu được sử dụng phổ

biến trong giai đoạn sàng lọc ban đầu nhằm xác định tiềm năng sinh học của các hợp chất tự nhiên. Các phương pháp như MTT thường được sử dụng để xác định khả năng giảm số lượng tế bào sống sau khi xử lý bằng mẫu thử.

Nhiều nghiên cứu cho thấy một số hợp chất từ thực vật có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư và có xu hướng thể hiện tính chọn lọc nhất định giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường. Tuy nhiên, hiệu quả và mức độ an toàn phụ thuộc vào bản chất hợp chất, nồng độ và điều kiện thử nghiệm [85, 209]. Nguyễn và cộng sự (2021) [168] đã nghiên cứu khả năng ức chế tăng sinh của dịch chiết Xáo tam phân và Diệp hạ châu, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sàng lọc hoạt tính sinh học. Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận dịch chiết Xáo tam phân trong methanol có khả năng gây giảm số lượng tế bào ung thư tuyến tụy, tế bào ung thư gan và ảnh hưởng đến quá trình chết theo chương trình của một số dòng tế bào ung thư vú [165-167, 216]. Các kết quả chủ yếu mang tính sàng lọc ban đầu và cần được đánh giá thêm để làm rõ cơ chế và khả năng ứng dụng thực tiễn.

1.5.4. Một số nghiên cứu liên quan đến việc đánh giá hoạt tính sinh học in vitro đối với hai cây dược liệu ĐS và BLMH

1.5.4.1. Một số nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học của rễ ĐS

Rễ ĐS đã được chứng minh là nguồn nguyên liệu giàu hợp chất sinh học với nhiều hoạt tính đáng chú ý. Các nghiên cứu cho thấy bột rễ ĐS có khả năng chống oxy hóa mạnh hơn so với cam thảo, trà và gừng. Dịch chiết rễ ĐS trong hexane, hoạt động như những chất chống oxy hóa sơ cấp hiệu quả, có khả năng ngăn chặn chuỗi phản ứng tự oxy hóa lipid bằng cách phản ứng nhanh với các gốc tự do [84]. Hiệu quả này chủ yếu liên quan đến các hợp chất quinone như tanshinone IIA, cryptotanshinone và dihydrotanshinone I [292]

Ngoài ra, các hợp chất như Cryptotanshinone còn thể hiện khả năng kháng khuẩn thông qua cơ chế ức chế chuỗi hô hấp và làm mất điện thế màng tế bào vi khuẩn, đặc biệt hiệu quả đối với vi khuẩn Gram dương, bao gồm cả các chủng kháng đa thuốc [49].

Nhóm hợp chất tanshinone cũng được ghi nhận thể hiện hoạt tính chống ung thư mạnh mẽ thông qua việc ức chế sự phát triển và tăng sinh của nhiều dòng tế bào ung thư như ung thư vú, gan và phổi thông qua các cơ chế như cảm ứng chết tế bào theo chương trình và ức chế chu trình tế bào [53, 265].

Nguyễn Hữu Tùng và cộng sự (2016) [14] cho thấy các cao chiết, phân đoạn và các hợp chất tinh chế từ ĐS đều có khả năng ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư máu người trong điều kiện *in vitro*. Trong đó, một số hợp chất tinh khiết thể hiện hoạt tính mạnh, tiêu biểu là trijuganone C với giá trị IC_{50} thấp trên các dòng tế bào HL-60, Jurkat, THP-1 và U937, cho thấy tiềm năng ứng dụng nghiên cứu phát triển hoạt chất chống ung thư. Bên cạnh đó, các kết quả bước đầu cũng định hướng việc khảo sát cơ chế gây chết tế bào theo con đường apoptosis đối với các mẫu có hoạt tính cao.

Các đặc tính dược học khác nhau của ĐS, từ chiết tách hợp chất hoạt tính, xác định cấu trúc, đến đánh giá tác dụng sinh học đã được trình bày chi tiết trong Mục 1.1.1.4, cho thấy đây là một nguồn dược liệu có giá trị cao, phù hợp định hướng khai thác trong nghiên cứu và ứng dụng công nghệ thực phẩm-dược phẩm.

1.5.4.2. Một số nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học của thân rễ BLMH

Thân rễ BLMH được ghi nhận là nguồn nguyên liệu giàu saponin steroid với nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý. Các nghiên cứu cho thấy chiết xuất từ thân rễ BLMH, đặc biệt là chiết xuất ethanol và methanol, chứa hàm lượng cao các hợp chất phenolic và flavonoid, từ đó thể hiện khả năng chống oxy hóa mạnh thông qua các cơ chế quét gốc tự do [135, 156].

Ngoài ra, chiết xuất BLMH còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đáng kể đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương, trong đó các steroidal saponin được xác định là thành phần đóng vai trò chính [201] Bên cạnh đó, các hợp chất như polyphyllin D và dioscin cũng được ghi nhận có khả năng ức chế tăng sinh tế bào trên nhiều dòng tế bào ung thư thông qua các cơ chế như cảm ứng apoptosis và điều hòa biểu hiện protein liên quan [134, 135, 270].

Nhiều nghiên cứu về các tính chất dược học, trong đó có chiết tách, đánh giá hoạt chất, hoạt tính của thân rễ BLMH đã trình bày ở nội dung 1.1.2.4 thể hiện đây là một nguồn dược liệu có giá trị cao và phù hợp định hướng nghiên cứu, phát triển sản phẩm ứng dụng trong dược phẩm và thực phẩm chức năng.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

2.1.1. Nguyên liệu

Rễ ĐS (*S. miltiorrhiza* Bunge) được thu hái tại huyện Sìn Hồ, tỉnh Lai Châu (vĩ độ 22,359586°B, kinh độ 103,250646°Đ) vào ngày 18/2/2022. Mẫu nguyên liệu được thu hoạch ở giai đoạn 1-2 năm tuổi, được đánh giá là tối ưu về hàm lượng hoạt chất sinh học và phù hợp làm dược liệu theo quy chuẩn dược liệu hiện hành.



Hình 2. 1. Nguyên liệu Rễ ĐS

Thân rễ BLMH (*P. polyphylla* Smith*)* được thu hái tại huyện Mù Cang Chải, tỉnh Yên Bái (vĩ độ 21.838733°B, kinh độ 104.108827°Đ) vào ngày 20/2/2022. Căn cứ vào số đốt tích lũy trên thân rễ, mẫu nguyên liệu được xác định có độ tuổi từ 6-7 năm, phù hợp với giai đoạn sinh trưởng có hàm lượng saponin steroid và các hợp chất thứ cấp đạt mức cao, thích hợp cho mục đích sử dụng làm dược liệu chất lượng.



Hình 2. 2. Nguyên liệu thân rễ BLMH

Sau khi thu hoạch, nguyên liệu được bảo quản tạm thời bằng cách vùi trong cát ẩm trong thùng nhằm hạn chế thất thoát nước và suy giảm hoạt chất, sau đó được vận chuyển về Trường Đại học Nha Trang để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

Nguyên liệu được định danh thực vật học dựa trên các đặc điểm hình thái và đối chiếu với tài liệu phân loại, nhằm đảm bảo tính chính xác của loài nguyên liệu sử dụng trong luận án.

2.1.2. Hóa chất, thiết bị, dụng cụ

Các hóa chất phân tích bao gồm: thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck); acid gallic, catechin, escin, atropine (Shanghai Zhanyun Chemical Com., Ltd.); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (TCI); 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), Catechin Hydrate, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (AK Scientific); Acetonitrile (Scharlau, Spain); Sodium carbonate khan, sodium nitrite, sodium hydroxide, methanol, vanillin, acid sulfuric, acid citric, acid hydrochloride, disodium phosphate, potassium persulfate (Xilong Chemical Co., Ltd.); Bromocresol green (Shanghai Lanji Technology Development Co., Ltd.); Aluminium chloride, glacial acetic acid, ferric chloride, ethanol (Guangdong Guanghua Sci-Tech Co., Ltd.); Chloroform (Vn-Chemsol Co., Ltd.); chất chuẩn Polyphyllin D, Falcarindiol (Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd.), chất chuẩn Tanshinone I, Cryptotanshinone (Sigma-Aldrich Chemie, Co.). Các hóa chất này có độ tinh khiết 99%, dùng được trong phân tích hóa học.

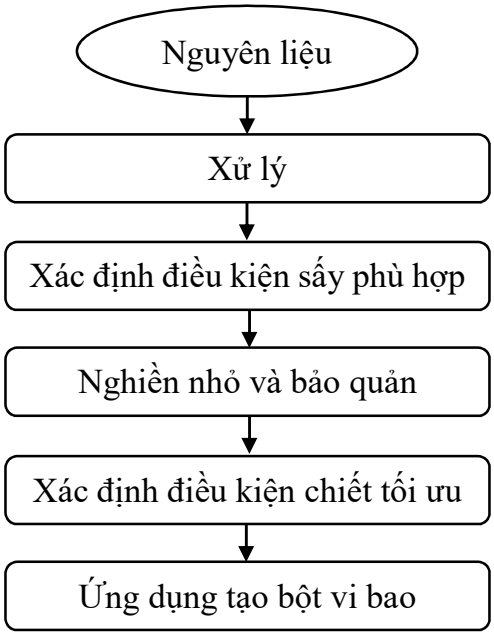
Luận án đã sử dụng các thiết bị bao gồm: Cân phân tích Ohaus PX224E 220 g/0,0001 g, Mỹ; Máy đo màu Konica Minolta Chroma Meter CR400/410, Nhật; Máy đo hoạt độ nước Hygrolab C1-Set-40, Rotronic, Thụy Sĩ; Máy quang phổ UV-Vis Libra S50, Biochrom, Vương quốc Anh, chức năng quét phổ, bước sóng 190-1100 nm; Bể ổn nhiệt VS-310SWR, Vision Scientific, Hàn Quốc, ổn nhiệt từ 5-99ºC; Thiết bị sấy thăng hoa Telstar model LyoBeta 35; Máy nghiền cắt SM100, Retsch, Đức, thu bột mịn: 0,25-20 mm; Máy cô quay mẫu chân không, Buchi, Thụy Sỹ; Lò vi sóng Electrolux EMS3067X, công suất 900 W; Bể rửa siêu âm có gia nhiệt Elmasonic S300H Elma, Đức, tần số siêu âm 37 kHz, công suất tiêu thụ 1500 W; Máy đồng hóa IKA T25; Tủ sấy không khí nóng Memmert; Máy sấy chân không; Tủ sấy lạnh; Tủ sấy hồng ngoại; Tủ đông Sanaky…

Các dụng cụ cần thiết: micropipet, bình tam giác, giấy lọc, cốc thủy tinh, ống nghiệm, ống ly tâm, phễu lọc, bộ rây…

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm tổng quát

2.2.1.1. Sơ đồ



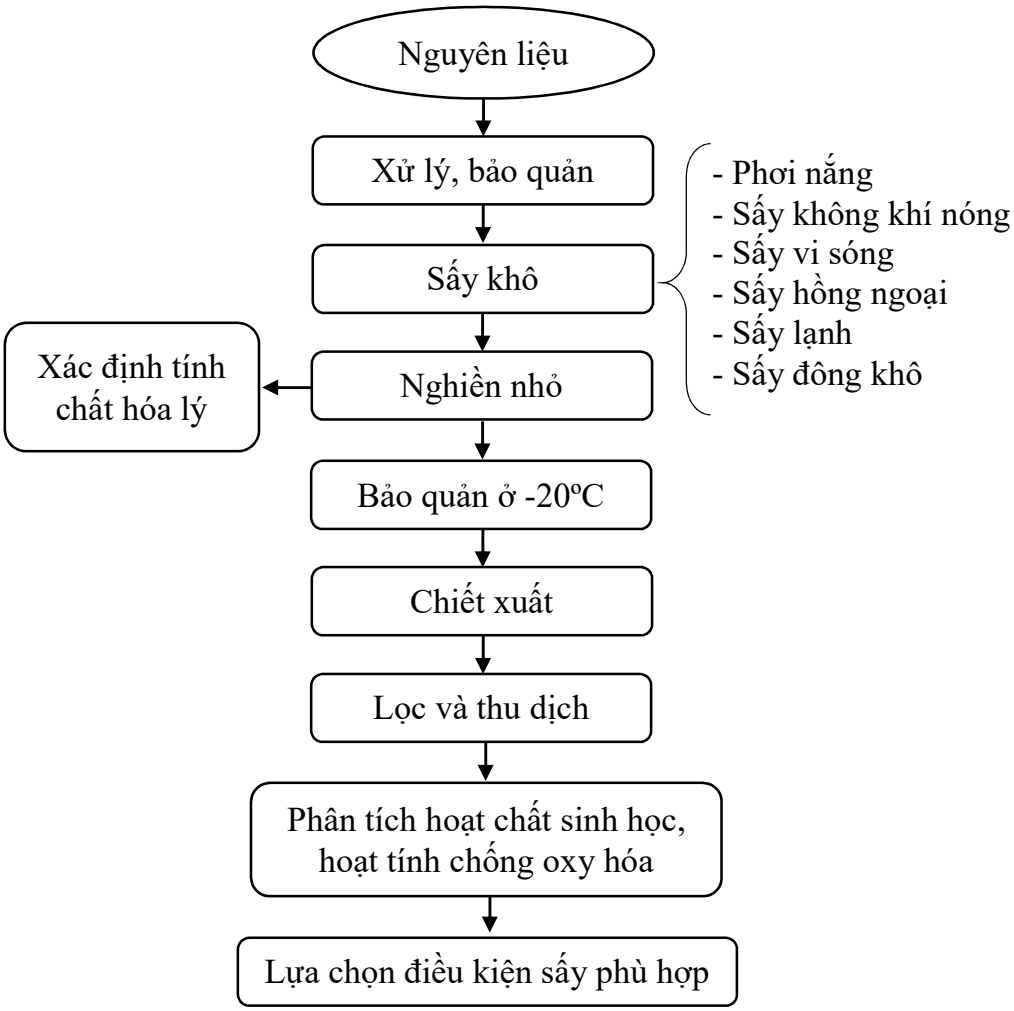
Hình 2. 3. Sơ đồ bố trí thí nghiệm tổng quát

2.2.1.2. Thuyết minh

Quy trình nghiên cứu tổng quát được triển khai theo trình tự liên hoàn từ nguyên liệu đến sản phẩm ứng dụng. Trước hết, nguyên liệu được thu nhận và xử lý sơ bộ nhằm loại bỏ tạp chất, ổn định chất lượng và đảm bảo tính đồng nhất cho các thí nghiệm tiếp theo. Tiếp theo, nguyên liệu được đưa vào nghiên cứu lựa chọn điều kiện sấy phù hợp với mục tiêu làm giảm hàm lượng ẩm, hạn chế biến đổi bất lợi về cấu trúc và màu sắc, đồng thời bảo tồn tối đa các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa. Trên cơ sở nguyên liệu đã sấy, nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất được thực hiện nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi các hoạt chất, cải thiện hàm lượng các thành phần có hoạt tính sinh học và tăng cường hiệu quả sinh học của dịch chiết. Cuối cùng, dịch chiết thu được được ứng dụng trong quá trình tạo bột vi bao với mục tiêu nâng cao độ ổn định, tăng khả năng bảo lưu hoạt chất trong quá trình bảo quản và xử lý tiếp theo, qua đó mở rộng tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định điều kiện sấy phù hợp

2.2.2.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm: được trình bày trong Hình 2.4.



Hình 2. 4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định điều kiện sấy

2.2.2.2. Thuyết minh

Xử lý và bảo quản nguyên liệu: Nguyên liệu được rửa sạch bằng nước cất để loại bỏ tạp chất, để ráo và loại bỏ các phần không đạt chất lượng. Rễ ĐS được cắt sơ bộ thành khúc dài 12–15 cm, trong khi thân rễ BLMH được cắt lát dày 4–5 mm. Nhằm đảm bảo tính đồng nhất và ổn định của nguyên liệu trong suốt quá trình nghiên cứu, mẫu sau xử lý được đóng gói trong túi PA zip kín và bảo quản tại nhiệt độ −20±2 °C. Quá trình cấp đông và rã đông đã được kiểm tra cho thấy ít gây ra những biến đổi về cấu trúc tế bào, thất thoát hoạt chất nên việc áp dụng cùng một quy trình bảo quản cho toàn bộ lô nguyên liệu giúp kiểm soát sai số hệ thống, đảm bảo tính khách quan khi so sánh hiệu quả giữa các phương pháp sấy.

Sấy khô:

Trước khi thực hiện các thí nghiệm sấy, mẫu được rã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Để tăng diện tích tiếp xúc và tạo sự đồng đều của nguyên liệu, rễ ĐS được cắt tiếp thành đoạn dài 2–3 cm, còn thân rễ BLMH được cắt thành sợi dày 2–3 mm và dài 2–3 cm.

Nguyên liệu được khảo sát qua các phương pháp sấy bao gồm: phơi nắng (SU), sấy không khí nóng (HAD), sấy hồng ngoại (IRD), sấy lạnh (LAD), sấy vi sóng (MWD) và sấy đông khô (FRD) theo các điều kiện cụ thể tại Bảng 2.1.

Để theo dõi sự biến đổi độ ẩm của nguyên liệu theo thời gian, mẫu được chia vào các chén sứ riêng biệt, mỗi chén chứa 5 g nguyên liệu. Chén sứ có đường kính 8 cm và diện tích 50,2 cm^2, tương ứng với mật độ bố trí mẫu khoảng 0,10 g/cm^2 (1,0 kg/m^2). Khối lượng mẫu được xác định định kỳ 30 phút/lần đối với phơi nắng, sấy không khí nóng, sấy hồng ngoại và sấy lạnh; riêng đối với sấy vi sóng, khoảng thời gian xác định khối lượng là 2 phút/lần. Riêng phương pháp sấy đông khô, do đặc thù vận hành trong môi trường chân không sâu và cơ chế thăng hoa kín, các thông số môi trường không được theo dõi liên tục theo thời gian. Từ số liệu khối lượng thu được, độ ẩm của mẫu tại các thời điểm được xác định và sử dụng để xây dựng đường cong sấy biểu diễn sự biến đổi độ ẩm theo thời gian ở từng điều kiện sấy.

Để thu đủ lượng mẫu phục vụ xác định các chỉ tiêu hóa lý, hàm lượng hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa, mỗi điều kiện sấy được thực hiện riêng với 50 g nguyên liệu. Quá trình sấy được theo dõi đến khi khối lượng mẫu không đổi giữa hai lần cân liên tiếp.

Mẫu sau sấy được làm nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng, đóng gói trong túi PA zip kín và bảo quản ở -20±2 °C để duy trì độ ổn định trước khi phân tích.

Bảng 2. 1. Phương pháp và điều kiện sấy nguyên liệu

Điều kiện sấy	Rễ ĐS	Thân rễ BLMH
Phơi nắng (SD)	Thời gian thực hiện: 9h–16h, nhiệt độ 28-35 °C, độ ẩm tương đối không khí 68-75,23%.	Thời gian thực hiện: 9h–16h, nhiệt độ 28-37 °C, độ ẩm tương đối 70,24 - 75,54%.
Sấy không khí nóng (HAD)	HAD50: nhiệt độ 50±2 °C, độ ẩm tương đối 38,68±3,49%; HAD60: nhiệt độ 60±2 °C, độ ẩm tương đối 34,27 ±5,2%; HAD70: nhiệt độ 70±2 °C, độ ẩm tương đối 23,50±1,83%; Vận tốc gió 0,8±0,1 m/s.	HAD50: nhiệt độ 50±2 °C, độ ẩm tương đối 34,80±5,08%; HAD60: nhiệt độ 60±2 °C độ ẩm tương đối 26,18±1,07%; HAD70: nhiệt độ 70±2 °C, độ ẩm tương đối 13,76±3,53%; Vận tốc gió 0,8±0,1 m/s.
Sấy hồng ngoại (IRD)	IRD40: nhiệt độ 40±1 °C, độ ẩm tương đối 39,00±1,22%; IRD45: nhiệt độ 45±2 °C, độ ẩm tương đối 31,72±1,14%; IRD50: nhiệt độ 50±2 °C, độ ẩm tương đối 20,58±1,77%. Vận tốc gió 1,0±0,1 m/s.	IRD40: nhiệt độ 40±1 °C, độ ẩm tương đối 44,30±2,11%; IRD45: nhiệt độ 45±2 °C, độ ẩm tương đối 34,84±1,42%; IRD50: nhiệt độ 50±2 °C, độ ẩm tương đối 23,23±3,48%. Vận tốc gió 0,8±0,1 m/s.
Sấy vi sóng (MWD)	MWD270: 270W (30% công suất máy), tương đương 5,4 W/g. MWD450: 450W (50% công suất máy), tương đương 9,0 W/g. MWD720: 720W (80% công suất máy), tương đương 14,4 W/g.	MWD270: 270W (30% công suất máy), tương đương 5,4 W/g. MWD450: 450W (50% công suất máy), tương đương 9,0 W/g. MWD720: 720W (80% công suất máy), tương đương 14,4 W/g.
Sấy lạnh (LAD)	LAD30: nhiệt độ 30±1 °C, độ ẩm tương đối 42,08±4,22%. LAD35: nhiệt độ 35±1 °C, độ ẩm tương đối 36,03±1,31%. LAD40: nhiệt độ 40±1 °C, độ ẩm tương đối 21,40±7,82%. Vận tốc gió 2,0±0,2 m/s.	LAD30: nhiệt độ 30±1 °C, độ ẩm tương đối 46,37±2,44%. LAD35: nhiệt độ 35±1 °C, độ ẩm tương đối 35,76±4,37%. LAD40: nhiệt độ 40±1 °C, độ ẩm tương đối 29,03±3,40%. Vận tốc gió 1,6±0,2 m/s.
Sấy đông khô (FRD)	0,056 mBar, -38,0 °C, 48 h.	0,056 mBar, -38,0 °C, 48 h.

Nghiền: Sau khi sấy, các mẫu được nghiền mịn và sàng qua rây có kích thước lỗ 1 mm. Quá trình này nhằm thiết lập sự đồng nhất về cấu trúc bề mặt và đặc tính quang học giữa các mẫu, giúp hạn chế tối đa sai số đo màu phát sinh từ sự khác biệt về hàm lượng ẩm hay hình thái cấu trúc vật lý. Bột mẫu sau đó được đóng gói trong túi PA zip kín và bảo quản ở điều kiện -20±2 °C để duy trì độ ổn định của các hoạt chất trước khi tiến hành các phân tích tiếp theo.

Xác định tính chất hóa lý: Bột mẫu được đánh giá các chỉ tiêu: màu sắc, độ ẩm, hoạt độ nước (aw), tiêu thụ năng lượng, thời gian sấy, năng suất sấy và năng suất chiết.

Chiết mẫu: Mẫu sấy sau khi nghiền được tiến hành chiết bằng methanol 100% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:100 (w/v) đối với rễ ĐS và 1:40 (w/v) đối với thân rễ BLMH ở 50 °C trong 60 phút. Sau chiết, dung dịch được làm nguội nhanh về nhiệt độ môi trường trước khi tiến hành các bước xử lý tiếp theo.

Lọc và thu dịch chiết: Sau khi chiết, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Newstar 102 để thu dịch chiết. Thể tích dịch chiết được định mức về ban đầu bằng methanol 100% để bù lại phần bay hơi trong quá trình xử lý, tạo thuận lợi cho phân tích tiếp theo.

Phân tích hoạt chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa: Các chỉ tiêu phân tích bao gồm hàm lượng saponin tổng số (TSC), phenolic tổng số (TPC), flavonoid tổng số (TFC), alkaloid tổng số (TAC) cùng với khả năng chống oxy hóa thông qua các phương pháp khử gốc tự do ABTS/DPPH (ARSC/DRSC) và khử sắt (FRAP).

Lựa chọn chế độ sấy phù hợp: Kết hợp dữ liệu về tính chất hóa lý với hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa để lựa chọn phương pháp sấy phù hợp nhất cho bảo toàn chất lượng dược liệu.

2.2.3. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu điều kiện chiết

2.2.3.1. Bố trí thí nghiệm tổng quát:

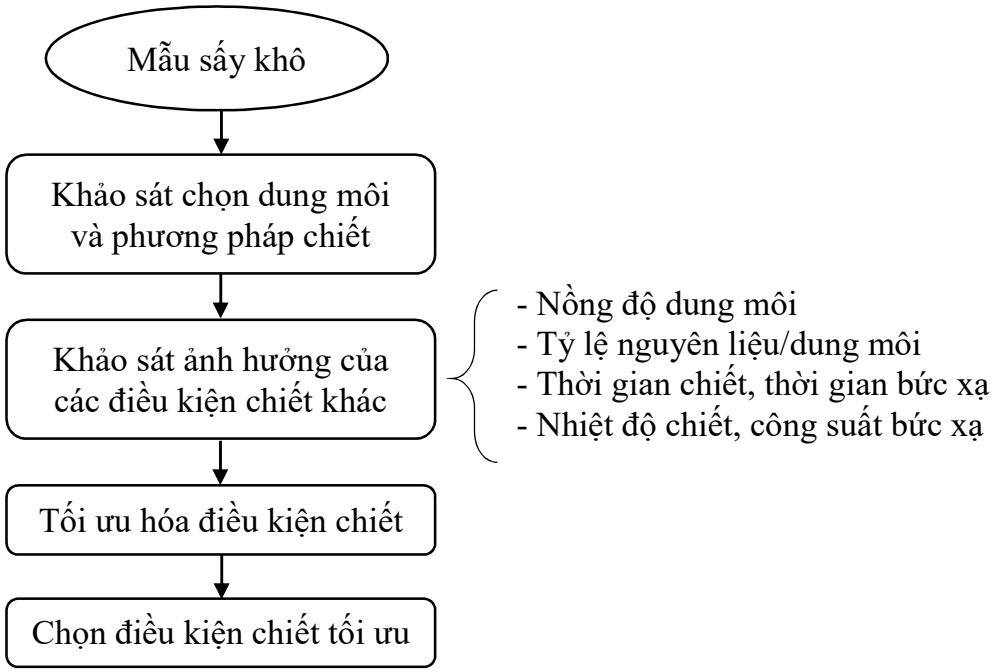
Sơ đồ bố trí thí nghiệm nghiên cứu điều kiện chiết được trình bày trong Hình 2.5.

Thuyết minh:

Tiến hành khảo sát lựa chọn loại dung môi và phương pháp chiết phù hợp, sau đó sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện chiết khác. Các yếu tố và thông số chiết được lựa chọn dựa trên các tài liệu tham khảo đã công bố về cây dược liệu, đặc tính hóa học của hợp chất mục tiêu, kết quả khảo sát đơn yếu tố ban đầu và điều kiện trang thiết bị thực tế.

Các yếu tố khảo sát bao gồm nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết, thời gian bức xạ và công suất vi sóng. Các yếu tố này được khảo sát nhằm đánh giá sự thay đổi của hàm lượng hoạt chất sinh học (TPC, TSC) và hoạt tính chống oxy hóa (DRSC, ARSC, FRAP). Thực nghiệm đơn yếu tố giúp xác định được xu hướng ảnh hưởng của từng yếu tố và thu hẹp khoảng biên phù hợp trước khi tiến hành tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng.

Thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình Box-Behnken, xây dựng phương trình hồi quy và chọn ra điều kiện chiết tối ưu. Tiến hành chiết ở các điều kiện tối ưu để kiểm chứng với kết quả thu được từ phương trình hồi quy.



Hình 2. 5. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định điều kiện chiết

2.2.3.2. Bố trí thí nghiệm chọn loại dung môi và phương pháp chiết

a. Bố trí thí nghiệm chọn loại dung môi chiết

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các loại dung môi bằng phương pháp chiết truyền thống trong bể ổn nhiệt theo các điều kiện trình bày tại Bảng 2.2.

Sau chiết, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Newstar 102 để loại tạp chất/bã, đồng thời bổ sung dung môi để bù lại lượng bay hơi và tổn thất trong quá trình xử lý. Mẫu dịch chiết sau lọc được bảo quản ở -20±2 °C đến khi phân tích. Các chỉ tiêu được đánh giá gồm hàm lượng hoạt chất sinh học (TPC, TFC, TSC) và hoạt tính chống oxy hóa

(ARSC, DRSC, FRAP). Kết quả thu được dùng để chọn dung môi chiết phù hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. 2. Điều kiện chiết để lựa chọn của dung môi phù hợp

Điều kiện chiết	Rễ ĐS	Thân rễ BLMH
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi	1:100 (g/mL)	1:40 (g/mL)
Nhiệt độ chiết	50±1 °C	50±1 °C
Thời gian chiết	60 phút	60 phút
Loại dung môi: nước, methanol nguyên chất (Me100), methanol nồng độ 50% (Me50), ethanol nguyên chất (E100), ethanol nồng độ 50% (E50), aceton nguyên chất (AC100), aceton nồng độ 50% (AC50), ethyl acetate (EA), chloroform (Cl).		

b. Bố trí thí nghiệm chọn phương pháp chiết

Tiếp theo, tiến hành so sánh 3 phương pháp chiết bao gồm CE, MAE và UAE với dung môi đã được lựa chọn và các điều kiện thiết lập trong Bảng 2.3.

Sau khi chiết, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Newstar 102, đồng thời bổ sung dung môi để bù lại lượng bay hơi và tổn thất trong quá trình xử lý. Mẫu sau lọc được bảo quản ở -20±2 °C đến khi phân tích. Các chỉ tiêu đánh giá gồm hàm lượng hoạt chất sinh học (TSC, TPC, TFC) và hoạt tính chống oxy hóa (ARSC, DRSC, FRAP). Kết quả được sử dụng để lựa chọn phương pháp chiết phù hợp cho bước nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. 3. Điều kiện chiết để lựa chọn phương pháp chiết phù hợp

Phương pháp chiết	Rễ ĐS	Thân rễ BLMH
Chiết truyền thống (CE)		
- Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi	1:100 g/mL	1:40 g/mL
- Nhiệt độ chiết	50±1 °C	50±1 °C
- Thời gian chiết	60 phút	60 phút
Chiết hỗ trợ vi sóng (MAE)		
- Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi	1:100 g/mL	1:40 g/mL
- Công suất	450W	450W
- Thời gian bức xạ	4 giây/phút	4 giây/phút
- Thời gian chiết	60 phút	60 phút
Chiết hỗ trợ siêu âm (UAE)		
- Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi	1:100 g/mL	1:40 g/mL
- Nhiệt độ chiết	50±1 °C	50±1 °C
- Thời gian chiết	60 phút	60 phút

- Công suất siêu âm	1500W	1500W

2.2.3.3. Bố trí thí nghiệm khảo sát vùng biên và tối ưu hóa điều kiện chiết rễ ĐS

a. Bố trí thí nghiệm khảo sát vùng biên của các điều kiện chiết rễ ĐS

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố công nghệ riêng lẻ, bao gồm nồng độ dung môi, nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi. Trong quá trình khảo sát một yếu tố, các yếu tố còn lại được giữ cố định tại giá trị ở tâm như trình bày trong Bảng 2.4. Các điều kiện dung môi và phương pháp chiết được lựa chọn từ kết quả khảo sát trước đó.

Dịch chiết thu được sử dụng để phân tích hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa (TSC, TPC, FRAP) nhằm xác định vùng biên (giới hạn khảo sát) của từng yếu tố chiết, làm cơ sở thiết lập miền khảo sát trong thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM).

Bảng 2. 4. Bảng thông số khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chiết rễ ĐS

Nồng độ dung môi (%)		30	**50**	70	90	
Nhiệt độ (°C)	30	40	**50**	60	70	80
Thời gian (phút)		10	**20**	30	40	
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)	1/20	1/40	**1/60**	1/80	1/100	

b. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết rễ ĐS bằng phương pháp RSM theo mô hình Box-Behnken

Để đánh giá ảnh hưởng đồng thời và tối ưu hóa các điều kiện trích ly bột rễ ĐS, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình Box-Behnken được sử dụng. Thí nghiệm được thiết lập với 4 yếu tố độc lập, bao gồm: nồng độ dung môi (X_1, %); nhiệt độ chiết (X_2, °C); thời gian chiết (X_3, phút); và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (X_4, mL/g).

Nguyên tắc mã hóa biến số: Các biến độc lập được khảo sát ở 3 mức, ký hiệu bằng các giá trị mã hóa là -1 (mức thấp), 0 (mức trung tâm) và +1 (mức cao). Việc mã hóa các biến thực được thực hiện theo công thức:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \qquad (2.1)$$

Trong đó: x_i: giá trị mã hóa của biến độc lập

X_i: giá trị thực của biến độc lập

X_0: giá trị thực của biến độc lập ở mức trung tâm

ΔX: khoảng biến thiên giữa các mức

Các giá trị thực tương ứng với các mức mã hóa sẽ được xác định cụ thể dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố (trình bày tại mục [2.2.3.3.a]), nhằm đảm bảo vùng khảo sát bao phủ được điểm tối ưu của hệ thống.

Các hàm mục tiêu chính gồm hàm lượng saponin tổng số (TSC, Y_1), hiệu suất trích ly saponin (SEE, Y_2), đồng thời theo dõi hàm lượng phenolic tổng số (TPC, Y_3), khả năng chống oxy hóa qua khả năng quét gốc tự do ABTS (ARSC, Y_4) và khử sắt (FRAP, Y_5) để đánh giá toàn diện quá trình chiết.

Ma trận thực nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behnken, với 27 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm tại tâm, chi tiết bố trí trình bày ở Phụ lục 3.1.

Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{24}X_2X_4 + \beta_{34}X_3X_4 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{44}X_4^2 \quad (2.2)$$

Trong đó: Y: hàm mục tiêu

$X_{i,j}$: biến mã hóa;

β_0, $\beta_{i,j}$: hệ số hồi quy

Sau khi xác định được điều kiện chiết tối ưu, tiến hành thí nghiệm xác nhận tại điểm tối ưu đã chọn, phân tích đồng thời các chỉ tiêu: TSC (Y_1), SEE (Y_2), TPC (Y_3), ARSC (Y_4) và FRAP (Y_5) để đối chiếu với giá trị dự đoán từ mô hình.

2.2.3.4. Bố trí thí nghiệm khảo sát vùng biên và tối ưu hóa điều kiện chiết thân rễ BLMH

a. Bố trí thí nghiệm khảo sát vùng biên của các điều kiện chiết thân rễ BLMH

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng riêng lẻ của từng yếu tố công nghệ, bao gồm nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian chiết, thời gian bức xạ và công suất vi sóng. Trong quá trình khảo sát một yếu tố, các yếu tố còn lại được giữ cố định tại giá trị ở tâm như trình bày trong Bảng 2.5. Điều kiện dung môi và phương pháp chiết được lựa chọn từ kết quả khảo sát trước đó.

Dịch chiết thu được được phân tích hàm lượng hoạt chất sinh học (TSC, TPC) và khả năng chống oxy hóa (ARSC, FRAP) nhằm xác định vùng biên của các yếu tố khảo

sát, làm cơ sở thiết lập miền giá trị đầu vào trong thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp RSM theo mô hình Box-Behnken.

Bảng 2. 5 Bảng khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chiết thân rễ BLMH

Nồng độ dung môi (%)			30	**50**	70	90
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)			1/20	**1/30**	1/40	1/50
Thời gian (phút)		10	20	**30**	40	
Thời gian bức xạ (giây/phút)	2	4	6	**8**	10	12
Công suất (W)		200	400	**600**	800	1000

b. Bố trí thí thí nghiệm tối ưu hóa bằng phương pháp RSM theo mô hình Box-Behnken

Để đánh giá ảnh hưởng đồng thời và tối ưu hóa các điều kiện trích ly bột rễ ĐS, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với mô hình Box-Behnken được sử dụng. Thí nghiệm được thiết lập với 3 yếu tố độc lập, bao gồm: nồng độ dung môi ethanol (X_1, %), thời gian trích ly (X_2, phút) và thời gian bức xạ vi sóng (X_3, giây/phút).

Nguyên tắc mã hóa biến số: Các biến độc lập được mã hóa công thức (2.1).

Các giá trị thực tương ứng với các mức mã hóa sẽ được xác định cụ thể dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố (trình bày tại mục [2.2.3.4.a]), nhằm đảm bảo vùng khảo sát bao phủ được điểm tối ưu của hệ thống.

Các hàm mục tiêu chính gồm hàm lượng saponin tổng số (TSC, Y_1), hiệu suất trích ly saponin (SEE, Y_2), đồng thời theo dõi hàm lượng phenolic tổng số (TPC, Y_3), khả năng chống oxy hóa qua khả năng quét gốc tự do ABTS (ARSC, Y_4) và khử sắt (FRAP, Y_5) để đánh giá toàn diện quá trình chiết.

Thiết kế thí nghiệm Box-Behnken bao gồm tổng cộng 15 thí nghiệm, trong đó có 3 điểm lặp tại tâm để đảm bảo độ tin cậy và kiểm soát sai số thực nghiệm (Phụ lục 3.2).

Hàm mục tiêu sử dụng trong quá trình tối ưu hóa bao gồm: hàm lượng saponin tổng số (TSC, Y_1) và hiệu suất trích ly saponin (SEE, Y_2) là hai chỉ tiêu chính; đồng thời, các chỉ tiêu khác gồm hàm lượng phenolic tổng số (TPC, Y_3), khả năng khử gốc tự do (ARSC, Y_4) và khử sắt (FRAP, Y_5) cũng được xem xét nhằm đánh giá toàn diện hiệu quả thu hồi hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết.

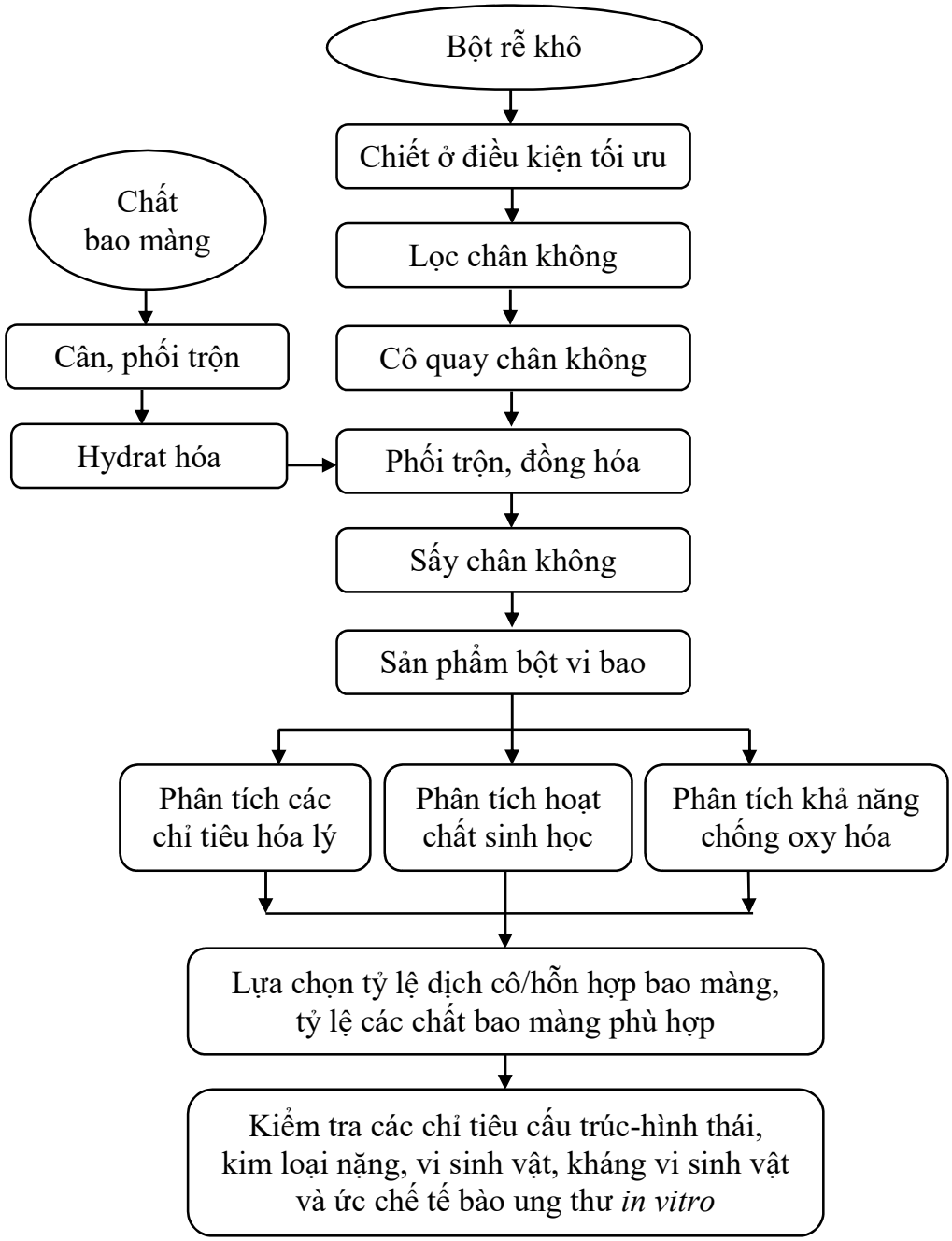
Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y = \beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_{12}X_1X_2+\beta_{13}X_1X_3+\beta_{23}X_2X_3+\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2+\beta_{33}X_3^2 \quad (2.3)$$

Sau khi xác định được điều kiện chiết tối ưu, tiến hành thí nghiệm xác nhận tại điểm tối ưu đã chọn. Mẫu được thực hiện lặp lại 3 lần, ngẫu nhiên hóa thứ tự và phân tích đồng thời các chỉ tiêu: TSC (Y_1), SEE (Y_2), TPC (Y_3), ARSC (Y_4) và FRAP (Y_5) để đối chiếu với giá trị dự đoán từ mô hình.

2.2.4. Bố trí thí nghiệm tạo bột vi bao từ rễ ĐS và thân rễ BLMH

2.2.4.1. Bố trí thí nghiệm



Hình 2. 6. Sơ đồ bố trí thí nghiệm sản xuất bột vi bao

2.2.4.2. Thuyết minh

- Chiết:

+ Bột rễ ĐS được chiết theo các điều kiện tối ưu đã xác định được trong mục 2.2.3.3.

+ Bột thân rễ BLMH được theo các điều kiện tối ưu đã xác định được trong mục 2.2.3.4.

- Lọc chân không: Sau khi kết thúc quá trình chiết, dịch chiết được làm nguội nhanh bằng cách ngâm trong nước lạnh đến nhiệt độ phòng nhằm hạn chế sự phân hủy của các hợp chất nhạy nhiệt. Sau đó, dịch chiết được lọc bằng hệ thống lọc chân không sử dụng phễu Buchner và giấy lọc Newman 102 dưới áp suất khoảng 70–75cmHg ở nhiệt độ phòng nhằm loại bỏ cặn không tan.

- Cô quay chân không: Dịch chiết sau lọc được cô quay chân không ở nhiệt độ bể gia nhiệt 55 °C, tốc độ quay 120 vòng/phút và áp suất tuyệt đối 110 mbar. Quá trình cô được tiến hành đến khi không còn dung môi ngưng tụ đáng kể trong bình thu và dịch chiết đạt trạng thái cô đặc, sánh, hàm lượng chất khô tăng rõ rệt.

Dịch cô đặc sau khi thu được được xác định hàm lượng chất khô làm cơ sở tính toán phối trộn. Mẫu được bảo quản trong điều kiện tránh ánh sáng và ở nhiệt độ -20±2 °C nhằm hạn chế oxy hóa và phân hủy hoạt chất.

- Phối trộn, hydrate hóa các chất bao màng

Các chất bao gồm maltodextrin (MD), gum arabic (GA), tinh bột biến tính (MCS) và pectin (PEC) được sử dụng theo các tỷ lệ khảo sát trong Bảng 2.6. Silica (SiO_2) được bổ sung 0,5% (w/w) nhằm hạn chế hiện tượng dính bám và chống vón.

Sau khi xác định hàm lượng chất khô, các chất bao được hòa tan trong nước cất theo tỷ lệ 1:1 (w/w), sau đó hydrate hóa ở 4 °C trong 20–24 giờ đến khi hệ polymer trương nở hoàn toàn, tạo dung dịch đồng nhất, không còn hiện tượng vón cục.

- Phối trộn, đồng hóa chất bao màng với dịch cô quay

Dịch cô quay được phối trộn với hỗn hợp chất bao màng đã hydrat hóa theo các tỷ lệ dịch cô quay/hỗn hợp chất bao màng được trình bày trong Bảng 2.6. Hỗn hợp được đồng hóa tốc độ 10000 vòng/phút trong 5 phút nhằm giảm kích thước giọt phân tán, tăng khả năng tương thích giữa hai pha và cải thiện độ ổn định của hệ trước khi sấy.

- Sấy chân không

Sau quá trình đồng hóa, mẫu thu được ở dạng hệ phân tán lỏng đồng nhất và được chuyển ngay sang công đoạn sấy chân không. Tiến hành sấy ở nhiệt độ 30-40°C, với độ chân không 73 cmHg trong 24 giờ, cho đến khi mẫu khô hoàn toàn. Sau khi sấy, mẫu được để nguội trong bình hút ẩm, sau đó xay nhỏ thu bột mịn và đóng gói trong túi PA hàn kín nhằm hạn chế hút ẩm trở lại và bảo vệ các hợp chất sinh học trước khi thực hiện các bước phân tích tiếp theo.

- Phân tích các chỉ tiêu hóa lý, hàm lượng hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa

Bột vi bao sau sấy được tiến hành xác định một số chỉ tiêu quan trọng nhằm đánh giá đặc tính chất lượng tổng thể của sản phẩm.

Các chỉ tiêu hóa lý bao gồm độ ẩm, hoạt độ nước (a_w), độ hòa tan và năng suất bao màng, được sử dụng để đánh giá khả năng bảo quản và độ ổn định của bột.

Đồng thời, hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa được xác định thông qua các chỉ tiêu TSC, TPC và FRAP, nhằm đánh giá hiệu quả bảo lưu hoạt chất của quá trình vi bao.

Bảng 2. 6. Bố trí thí nghiệm xác định tỷ lệ dịch cô quay/hỗn hợp chất bao màng và tỷ lệ các chất trong hỗn hợp bao màng

Mẫu	Tỷ lệ dịch cô/ hỗn hợp chất bao màng	Tỷ lệ các chất bao màng (% khối lượng)			
		MD	GA	MCS	PEC
1	60/40	4	1	4	1
2	60/40	5	1	3	1
3	60/40	3	1	5	1
4	50/50	4	1	4	1
5	50/50	5	1	3	1
6	50/50	3	1	5	1
7	40/60	4	1	4	1
8	40/60	3	1	5	1
9	40/60	5	1	3	1
0*	100/0				

MD: maltodextrin, GA: gum arabic, MCS: tinh bột ngô biến tính, PEC: pectin. 0: mẫu sấy không bao màng*

Kết quả phân tích được sử dụng làm cơ sở lựa chọn tỷ lệ phối trộn dịch cô quay/hệ chất bao màng cũng như công thức bao màng tối ưu, bảo đảm sự cân bằng giữa độ ổn định các tính chất vật lý và khả năng bảo toàn hoạt chất sinh học. Sản phẩm bột vi bao được kiểm tra theo các nhóm chỉ tiêu chính bao gồm:

- Các đặc tính cấu trúc và hình thái được khảo sát bằng thế zeta, phân bố kích thước hạt (DLS), ảnh hiển vi điện tử quét (SEM), nhiệt lượng vi sai quét (DSC), phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) và phổ nhiễu xạ tia X (XRD) nhằm làm rõ mức độ ổn định, trạng thái pha và cấu trúc màng bao của hệ vi bao.

- Các chỉ tiêu an toàn thực phẩm bao gồm tổng số vi sinh vật hiếu khí, tổng số bào tử nấm men-nấm mốc, *Coliforms*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* và hàm lượng kim loại nặng (Pb, As, Cd, Hg) nhằm đảm bảo độ an toàn và khả năng ứng dụng của bột vi bao trong phát triển thực phẩm chức năng theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 20-1:2024/BYT ban hành kèm theo Thông tư số 12/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 7 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

- Hoạt tính sinh học đặc hiệu được đánh giá thông qua khả năng kháng vi sinh vật và ức chế tế bào ung thư *in vitro*, nhằm xác định hiệu quả sinh học tiềm năng và tính ứng dụng của bột vi bao từ dịch chiết ĐS và BLMH.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Phương pháp xác định các tính chất hóa lý

2.3.1.1. Xác định thời gian sấy, tiêu thụ năng lượng, năng suất sấy và năng suất chiết

a. Thời gian sấy

Sử dụng đồng hồ bấm giờ để theo dõi các khoảng thời gian lấy mẫu nghiên cứu.

b. Tiêu thụ năng lượng

Tiêu thụ năng lượng điện của các phương pháp sấy được tính toán dựa trên công suất tiêu thụ của các bộ phận gia nhiệt trực tiếp trong thiết bị theo nghiên cứu của Xu và cộng sự [276]:

$$W_i = P_i \times t_i \qquad (2.4)$$

Trong đó, W_i là điện năng tiêu thụ (kWh)

P_i là công suất định mức của thiết bị (kW)

t_i là thời gian sấy (h).

c. Năng suất sấy (DY)

Năng suất sấy (Drying Yield - DY) được xác định dựa trên tỉ lệ giữa khối lượng mẫu khô sau sấy và khối lượng mẫu tươi ban đầu, tính theo công thức 2.5 [171]:

$$DY = \frac{m_{DS}}{m_{FS}}.100 \quad (2.5)$$

Trong đó, DY: năng suất sấy (g mẫu khô/100 g mẫu tươi)

m_{DS}: khối lượng mẫu khô sau sấy (g)

m_{FS}: khối lượng mẫu tươi trước khi sấy (g).

d. Năng suất chiết (EY)

Năng suất chiết (Extraction Yield - EY) được xác định dựa trên khối lượng chất khô thu hồi được từ dịch chiết so với khối lượng chất khô của mẫu đem chiết, tính theo công thức 2.6 [171]:

$$EY = \frac{m_{DE}}{m_{DS}}.100 \quad (2.6)$$

Trong đó, EY là năng suất chiết (g dịch chiết khô/100 g DM)

m_{DE}: khối lượng dịch chiết đã sấy khô (g)

m_{DS}: khối lượng chất khô của mẫu đem chiết (g).

2.3.1.2. Đo màu sắc

Màu sắc của bột được xác định bằng máy đo màu quang học (CHROMA METER CR400/410, Konica Minolta, Nhật Bản) dựa trên hệ màu không gian CIELab. Ba thông số thu được bao gồm L* biểu thị độ sáng (giá trị từ 0 – đen hoàn toàn đến 100 – trắng hoàn toàn); a* biểu thị sự chuyển biến màu từ xanh lục (giá trị âm) đến đỏ (giá trị dương); và b* biểu thị sự chuyển biến từ xanh lam (giá trị âm) đến vàng (giá trị dương).

Trước khi đo, thiết bị được hiệu chuẩn bằng tấm chuẩn trắng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu bột được nghiền mịn, trải đều và nén nhẹ trên đĩa đo để đảm bảo bề mặt đồng nhất, không có khoảng trống. Các phép đo được thực hiện ở nhiệt độ phòng, mỗi mẫu được đo lặp lại ít nhất 3 lần tại các vị trí khác nhau để lấy giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

Dựa trên các giá trị này, sự khác biệt về màu sắc tổng thể (ΔE) giữa mẫu bột và mẫu đối chứng (mẫu tươi) được tính toán theo phương trình 2.7 [248].

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2} \quad (2.7)$$

Trong đó, a_0^*, b_0^*, L_0^* là các giá trị màu sắc của mẫu đối chứng (hoặc mẫu chuẩn).

2.3.1.3. Phân tích độ ẩm và hoạt độ nước

a. Độ ẩm

Độ ẩm của mẫu được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo tiêu chuẩn AOAC [27]. Quy trình thực hiện gồm các bước sau: Chén sứ được sấy khô ở 105ºC đến khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm và cân xác định khối lượng (m_0). Cân chính xác khoảng 1 g mẫu bột cho vào chén sứ (m_1) và sấy mẫu trong tủ sấy ở nhiệt độ 105ºC trong 4 giờ. Sau khi sấy, mẫu được làm nguội trong bình hút ẩm từ 30-45 phút trước khi cân xác định khối lượng sau sấy (m_2).

Kết quả tính độ ẩm (X%) theo công thức:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0}.100 \quad (2.8)$$

Trong đó, m_0: khối lượng chén sứ sau khi sấy đến khối lượng không đổi (g)

m_1: khối lượng chén và mẫu trước khi sấy (g)

m_2: khối lượng mẫu và chén sau sấy đến khối lượng không đổi (g)

b. Hoạt độ nước (aw)

Hoạt độ nước của mẫu bột được xác định bằng máy đo hoạt độ nước Hygrolab C1-Set-40 (Đức). Mẫu bột được cho vào cốc, đảm bảo bề mặt phẳng và không có khoảng trống lớn, sau đó đặt vào buồng đo và đậy kín với đầu dò cảm biến. Phép đo được thực hiện ở nhiệt độ phòng (25±2 °C). Giá trị hoạt độ nước được ghi nhận khi hệ đạt trạng thái cân bằng ẩm, thể hiện qua sự ổn định của tín hiệu đo theo tiêu chí của thiết bị. Mỗi mẫu được đo lặp lại ba lần và kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình.

2.3.1.4. Xác định hiệu suất chiết saponin

Hiệu suất chiết saponin được xác định dựa vào phương pháp của Nguyen và cộng sự (2017) [177] . Hàm lượng saponin thu được trong một lần chiết (SCE) và tổng lượng saponin chiết kiệt (4-5 lần chiết - SCC) được xác định từ mẫu nguyên liệu tương ứng. Hiệu suất chiết saponin được tính theo công thức:

$$SEE = \frac{SCE}{SCC}.100 \quad (2.9)$$

Trong đó, SEE: hiệu suất chiết saponin (%)

SCE: hàm lượng saponin thu được trong một lần chiết ở điều kiện khảo sát (mg EE/g DM).

SCC: Tổng hàm lượng saponin trong mẫu, được xác định bằng phương pháp chiết kiệt (mg EE/g DM)

2.3.1.5. Xác định độ hòa tan trong nước

Độ hòa tan của bột vi bao được xác định theo phương pháp của Kha và cộng sự (2014) [124].

Giấy lọc được sấy đến khối lượng không đổi và cân xác định khối lượng (X_1). Cân chính xác 0,5 g mẫu bột (m) cho vào ống nghiệm, thêm 10 mL nước cất và tiến hành đồng nhất bằng máy Vortex. Mẫu được ủ ở 37 °C trong 15 phút để đảm bảo quá trình hòa tan diễn ra hoàn toàn. Sau đó, tiến hành lọc để tách phần không tan. Giấy lọc chứa phần không tan được sấy đến khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm và cân xác định khối lượng (X_2).

$$S = \frac{m-(X_2-X_1)}{m}.100 \qquad (2.10)$$

Trong đó, S: Độ hòa tan trong nước (%)

m: Khối lượng chất khô mẫu ban đầu (g)

X_1: Khối lượng giấy lọc sau sấy (g)

X_2: Khối lượng giấy lọc và phần không tan sau sấy (g)

2.3.1.6. Xác định năng suất bao màng

Năng suất bao màng (encapsulation yield) được xác định dựa theo phương pháp của Mong Thu và Krasaekoopt (2016) [240] có điều chỉnh về cơ sở chất khô để phù hợp với sản phẩm bột thu được bằng phương pháp sấy chân không. Trong nghiên cứu này, năng suất bao màng được hiểu là tỷ lệ giữa khối lượng chất khô của bột vi bao thu được sau sấy và tổng khối lượng chất khô đưa vào trước khi sấy. Chỉ tiêu này phản ánh mức độ thu hồi sản phẩm vi bao sau quá trình sấy, nghiền và thu nhận bột, không đồng nhất với hiệu suất bao gói hoạt chất.

$$X_2 = X_1.(1-\frac{M_c}{100}) \qquad (2.11)$$

$$H = \frac{X_2}{m}.100 \qquad (2.12)$$

Trong đó, M_C: Độ ẩm của mẫu vi bao sau sấy (%)

X_1: Khối lượng bột vi bao thu được sau sấy (g)

X_2: Khối lượng chất khô tuyệt đối mẫu vi bao thu được (g)

m: Tổng khối lượng chất khô đầu vào (bao gồm khối lượng chất khô trong dịch chiết và khối lượng các vật liệu bao (MD, GA, MCS, PEC, SiO_2) (g)

H: Năng suất bao màng (%)

2.3.1.7. Đo kích thước hạt và thế zeta

Đo kích thước hạt: Kích thước hạt của mẫu vi bao được xác định bằng phương pháp tán xạ động học ánh sáng (Dynamic Light Scattering-DLS) [35] sử dụng thiết bị Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd., UK). Mẫu bột vi bao được hòa tan trong nước cất (chỉ số khúc xạ 1,330) và được khuấy siêu âm 150 W trong 3-5 phút để phá vỡ cụm hạt lớn trước khi đo. Phép đo được thực hiện ở nhiệt độ 25 °C, trong cuvet nhựa dùng một lần, với các thông số mặc định của thiết bị: độ nhớt dung môi 0,8872 cP, vị trí tiêu điểm 4,65 mm và độ hấp thụ của mẫu 0,01. Mỗi mẫu được đo ít nhất ba lần liên tiếp, kết quả được trình bày dưới dạng phân bố cường độ theo kích thước hạt. Phần mềm Zetasizer v6.20 tự động tính toán giá trị kích thước trung bình (Z-average) và chỉ số đa phân tán (PDI).

Đo thế zeta: Thế zeta của các mẫu vi bao được xác định bằng tán xạ ánh sáng điện di (Electrophoretic Light Scattering-ELS) [35] trên thiết bị HORIBA SZ-100 (phần mềm SZ-100 for Windows, Z-Type v2.50). Mẫu được phân tán trong nước cất và pha loãng thích hợp để tránh đa tán xạ; phép đo thực hiện ở 25 °C, độ nhớt môi trường cài đặt 0,895 mPa.s và độ dẫn điện 0,216 mS/cm; điện áp điện cực áp vào 2,4V. Bột được phân tán vào nước cất, khuấy/siêu âm nhẹ để phá kết tụ thô nhưng tránh tạo bọt; loại bỏ tạp thô nếu có. Mẫu sau đó được nạp vào ô đo zeta theo khuyến cáo của hãng (đảm bảo không có bọt khí trong vùng quang học). Trước mỗi lần đo, tiến hành zero-check theo quy trình của thiết bị; sau đo, làm sạch ô đo bằng nước cất.

2.3.1.8. Chụp cấu trúc bề mặt

Cấu trúc và hình thái bề mặt của bột vi bao được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy – SEM) sử dụng thiết bị JMS-6510LV (JEOL, Nhật Bản). Mẫu bột sau sấy được làm khô hoàn toàn, phủ một lớp dẫn điện mỏng bằng phương pháp phún xạ nhằm tăng khả năng dẫn điện và hạn chế hiện tượng

tích điện bề mặt trong quá trình quan sát. Quá trình quan sát SEM được thực hiện trong chế độ chân không cao, với điện thế gia tốc được điều chỉnh trong khoảng phù hợp (khoảng 5-10 kV) và khoảng cách làm việc từ 6-12 mm. Các mẫu được quan sát ở nhiều độ phóng đại khác nhau để đánh giá hình dạng hạt, mức độ đồng đều, cấu trúc bề mặt, sự xuất hiện của các nếp nhăn, vùng lõm hoặc hiện tượng kết tụ hình thành trong quá trình sấy, từ đó cung cấp thông tin về sự hình thành cấu trúc vỏ bao và khả năng bảo vệ hoạt chất bên trong.

2.3.1.9. Phân tích phổ DSC

Phân tích nhiệt vi sai (Differential Scanning Calorimetry, DSC) được thực hiện trên thiết bị NETZSCH DSC 204 F1 Phoenix (Đức), dựa trên nghiên cứu trước đây với một vài điều chỉnh phù hợp [103].

Khoảng 4,92 mg mẫu được cân chính xác và đặt trong chén nhôm, với chén rỗng được sử dụng làm mẫu đối chứng. Quá trình đo được thực hiện trong khoảng nhiệt độ từ 30 đến 400 °C, với tốc độ gia nhiệt 10 °C/phút, dưới môi trường khí nitơ (N_2) nhằm hạn chế quá trình oxy hóa, với lưu lượng khí 25 mL/phút cho cả mẫu và đối chứng. Phép đo được tiến hành ở chế độ DSC/Sample, sử dụng cảm biến t-sensor/E.

Dữ liệu nhiệt được thu nhận và xử lý bằng phần mềm NETZSCH Proteus, cho phép xác định các đỉnh thu nhiệt/tỏa nhiệt, nhiệt độ chuyển pha và nhiệt enthalpy tương ứng của mẫu.

2.3.1.10. Phân tích phổ XRD

Phổ XRD được đo bằng X-ray diffractometer EQUINOX 5000 (INEL, Pháp) dựa theo nghiên cứu trước đây có một vài điều chỉnh [103]. Bức xạ Cu Kα (λ = 1,5406 Å) được dùng làm nguồn kích thích, phép đo được thực hiện ở chế độ đo θ-2θ, với góc quét 2θ từ 10 đến 70°, bước quét 0,02°/giây và tốc độ quét 1°/phút, ở điều kiện nhiệt độ phòng. Điện áp và cường độ dòng tia X lần lượt là 40 kV và 30 mA.

Mẫu bột được trải đều trên giá đỡ mẫu dạng phẳng, cố định chắc chắn để giảm sai số do rung lắc. Dữ liệu XRD thu được dùng để đánh giá trạng thái tinh thể/vô định hình của vật liệu và xác định các tín hiệu đặc trưng như đỉnh rộng của ma trận vô định hình hay đỉnh yếu do silica vô định hình.

2.3.1.11. Phân tích phổ TGA

Phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) được thực hiện trên thiết bị SETARAM Labsys TG, có tham khảo và điều chỉnh từ nghiên cứu trước đây [228]. Mẫu được cân chính xác (21,38 mg) bằng cân phân tích, sau đó đặt vào chén platin (100 µL) để tiến hành phân tích TGA trong môi trường khí N_2. Mẫu được gia nhiệt từ nhiệt độ phòng đến 900 °C với tốc độ 10 °C/phút. Kết quả xuất ra đường cong TGA (%) biểu diễn sự thay đổi khối lượng của mẫu theo nhiệt độ, và đường DTG (%/min) biểu diễn tốc độ phân hủy nhiệt tại từng điểm.

2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng hoạt chất sinh học

2.3.2.1. Hàm lượng saponin tổng số (TSC)

TSC được xác định theo phương pháp của Hiai và cộng sự, có một số điều chỉnh [98]. Lấy 0,5 mL dịch chiết trộn chung với 0,5 mL of dung dịch vanillin 8% (w/v) trong methanol. Sau đó bổ sung 5,0 mL dung dịch H_2SO_4 72% vào, lắc đều vào ngâm vào bể ổn nhiệt 70 °C trong 10 phút, sau đó làm nguội nhanh trong bể nước đá. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm bằng máy đo UV-VIS. Escin được dùng làm chất chuẩn. Kết quả TSC được thể hiện là tương đương milligram escin trên 1 gram chất khô (mg EE/g DM).

2.3.2.2. Hàm lượng phenolic tổng số (TPC)

TPC được xác định dựa trên phương pháp Folin-Ciocalteu theo các nghiên cứu trước đây, có một số điều chỉnh [227]. Lấy 0,5 mL dịch chiết trộn với 2,5 mL dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% (v/v) trong nước cất. Sau khi để ổn định 6 phút, bổ sung 2 mL dung dịch 7,5% (w/v) Na_2CO_3 và ủ tối 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm bằng máy đo UV-VIS. Acid gallic được sử dụng làm chất chuẩn. TPC được thể hiện là tương đương milligram acid gallic trên 1 gram chất khô (mg GAE/g DM).

2.3.2.3. Hàm lượng flavonoid tổng số (TFC)

TFC được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đây có một số điều chỉnh [225]. Trộn kỹ 2,0 mL methanol với 0,5 mL dịch chiết và 0,15 mL $NaNO_2$ (1,0 mol/L). Để yên 3 phút, sau đó bổ sung 0,15 mL $AlCl_3$ (10% w/v), trộn kỹ và để yên 3 phút. Bổ sung tiếp 1,0 mL NaOH (1,0 mol/L) và định lượng hỗn hợp về 5 mL bằng methanol. Để hỗn hợp trong bóng tối 40 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 505 nm bằng máy đo UV-VIS. Catechin được dùng làm chất chuẩn. Kết quả TFC được thể hiện là tương đương milligram catechin trên 1 gram chất khô (mg CE/g DM).

2.3.2.4. Hàm lượng alkaloid tổng số (TAC)

TAC được xác định dựa trên các nghiên cứu trước có một số điều chỉnh [220]. Đầu tiên, dịch chiết trong dung môi được bay hơi trong thiết bị sấy chân không ở 45 °C để thu được phần cặn khô. Phần cặn này được hòa tan trong dung dịch HCl 2N và lọc qua giấy lọc. Lấy 1 mL dịch lọc cho vào phễu chiết và rửa ba lần bằng cloroform (mỗi lần 10 mL). Sau đó, điều chỉnh pH của dung dịch về trung tính bằng dung dịch NH_4OH 25%. Tiếp theo, thêm 5 mL dung dịch Bromocresol green và 5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 4,7), lắc đều. Hợp chất tạo thành được chiết tiếp bằng 1, 2, 3 và 4 mL cloroform, lắc mạnh. Các phần chiết được thu gom và pha loãng đến vạch trong bình định mức 10 mL bằng cloroform. Độ hấp thụ quang được đo tại bước sóng 418 nm bằng máy quang phổ UV-VIS. Atropine được sử dụng làm chất chuẩn định lượng. Kết quả TAC được biểu thị bằng miligam tương đương atropine trên mỗi gram khối lượng khô (mg AE/g DW).

2.3.2.5. Phân tích các hoạt chất chính bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phương pháp định tính và định lượng hai hoạt chất sinh học chính trong rễ ĐS gồm Tanshinone I and Cryptotanshinone, được tham khảo dựa theo nghiên cứu của Shi và cộng sự [223], được thực hiện trên hệ thống ULPLC Thermo Fisher Ultimate 3000. Mẫu thử và chuẩn được hòa tan trong methanol 100%, lọc qua màng membrane nilon 0,45 µm và khử khí trước khi đưa vào máy. Pha động gồm methanol và formic acid 0,1% trong nước khử ion (70:30, v/v). Quá trình rửa giải đẳng dòng qua cột Hypersil GOLD™ PFP (3 µm x 2,1 mm x 150 mm) ở nhiệt độ 35 °C, với tốc độ dòng 0,25 mL/min. Các hợp chất được định tính và định lượng dựa trên thời gian lưu và diện tích peak, được phát hiện tại bước sóng 270 nm. Hàm lượng hoạt chất được tính toán từ đường chuẩn tương ứng và biểu thị dưới dạng miligram hoạt chất trên gram chất khô (mg/g DM).

Hai hoạt chất chính trong thân rễ BLMH gồm Falcarindiol and Polyphyllin D được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thực hiện trên máy Chromaster-Hitachi, có điều chỉnh dựa trên các nghiên cứu trước đây [21, 146, 298]. Mẫu thử và chuẩn được hòa tan trong methanol 100%, sau đó lọc qua màng membrane nilon kích thước lỗ 0,45 µm và khử khí trước khi đưa vào máy. Pha động gồm nước cất hai lần (A) và methanol (B) với chương trình rửa giải gradient như sau: 0-15 phút, 70% B; 15-20 phút, 90% B; 20-40 phút, 100% B; 40-45 phút, 100% B; 45-60 phút, 70% B. Quá trình tách được thực hiện trên cột Phenomenex Gemini C18 (5 µm x 4,6 mm x 250 mm), tốc độ dòng 0,7 mL/phút, thể tích bơm mẫu là 10 µL. Các hợp chất được định tính

và định lượng dựa vào thời gian lưu và diện tích peak, được phát hiện tại bước sóng 250 nm. Phần mềm Agilent OpenLab được sử dụng để xử lý tín hiệu và tính diện tích peak. Hàm lượng hoạt chất được tính toán dựa trên đường chuẩn tương ứng và biểu thị dưới dạng miligram hoạt chất trên 100 gram chất khô (mg/100 g DM).

2.3.3. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa in vitro

2.3.3.1. Khả năng quét gốc tự do ABTS (ARSC)

ARSC được đánh giá dựa trên các nghiên cứu trước đây có một vài điều chỉnh [237]. Trộn đều hai thể tích bằng nhau dung dịch ABTS 7,4 mM và potassium persulfate 2,6 mM và để trong phòng tối ở nhiệt độ phòng trong 12-15 h để tạo ra dung dịch gốc. Dung dịch gốc được giữ ở -20 °C cho đến khi dùng. Tiếp theo, pha loãng 1 mL dung dịch gốc với khoảng 60 mL methanol để tạo dung dịch làm việc, có độ hấp thụ 1,1±0,02 ở bước sóng 745 nm. Sau đó, lấy 0,2 mL dịch chiết phản ứng với 3,8 mL dung dịch làm việc, và giữ 120 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 745 nm bằng máy đo UV-VIS. Trolox được dùng làm chất chuẩn. Giá trị ARSC được thể hiện là tương đương milligam trolox trên 1 gram chất khô (mg TE/g DM).

2.3.3.2. Khả năng quét gốc tự do DPPH (DRSC)

DRSC được đánh giá dựa trên các nghiên cứu trước đây có một số điều chỉnh [37, 237]. Đầu tiên, dung dịch gốc được tạo thành khi hòa tan hoàn toàn 0,024 g DPPH vào 100 mL methanol và giữ trong phòng tối ở nhiệt độ phòng trong 12-15 h. Tiếp theo, chuẩn bị dung dịch làm việc bằng cách pha loãng 10 mL dung dịch gốc với 40-45 mL methanol có độ hấp thụ 1,1±0,02 ở bước sóng 517 nm. Sau đó, lấy 0,2 mL dịch chiết trộn kỹ với 3,8 mL dung dịch làm việc và để trong bóng tối 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 517 nm bằng máy đo UV-VIS. Trolox được dùng làm chất chuẩn. Giá trị DRSC được thể hiện là milligam tương đương trolox trên 1 gram chất khô (mg TE/g DM).

2.3.3.3. Khả năng chống oxy hóa bằng cách khử sắt (FRAP)

FRAP được xác định dựa trên phương pháp FRAP đã được công bố trước đó có một vài điều chỉnh [33, 237]. Chuẩn bị 3 loại thuốc thử, bao gồm: Thuốc thử A: đệm acetate (300 mM, pH 3,6); Thuốc thử B: 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine 10 mM; Thuốc thử C: $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM. Trộn 3 thuốc thử A:B:C với tỷ lệ 10:1:1 theo thể tích để tạo thành dung dịch làm việc. Sau đó trộn 0,2 mL dịch chiết với 3,8 mL dung dịch làm việc và để ở 37 °C trong bóng tối trong 30 phút. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng 597 nm

bằng máy đo UV-VIS. Trolox được dùng làm chất chuẩn, và giá trị FRAP được thể hiện là milligam tương đương trolox trên 1 gram chất khô (mg TE/g DM).

2.3.4. Phương pháp phân tích kim loại nặng

Bảng 2. 7. Các phương pháp phân tích kim loại nặng

STT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích
1	Hàm lượng chì (Pb)	TCVN 8126-1:2009 [8]
2	Hàm lượng thủy ngân (Hg)	TCVN 7604:2007 [6]
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	TCVN 7603:2007 [5]
4	Hàm lượng Asen (As)	TCVN 9521:2012 [10]

2.3.5. Phương pháp phân tích vi sinh vật và đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật in vitro

2.3.5.1. Phương pháp kiểm tra vi sinh vật

Bảng 2. 8. Các phương pháp phân tích vi sinh vật

STT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	TCVN 4884-1:2015 [2]
2	*Coliform*	TCVN 6848:2007 [4]
3	*Escherichia coli*	TCVN 7924-2:2008 [7]
4	*Staphylococcus aureus*	TCVN 4830:2005 [1]
5	Tổng số bào tử nấm men – nấm mốc	TCVN 8275:2010 [9]
6	*Clostridium perfringens*	TCVN 4991:2005 [3]

2.3.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật

Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm men được thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch và phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng theo hướng dẫn của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Hoa Kỳ [59-62]. Các chủng vi sinh vật thử nghiệm gồm *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella spp., Bacillus anthracis* và *Candida albicans*.

Phương pháp khuếch tán qua giếng thạch: Cho vào mỗi đĩa petri 25 mL môi trường thích hợp. Dùng môi trường MHA đối với vi khuẩn, môi trường MHA bổ sung glucose đối với nấm men. Chuẩn bị vi sinh vật thử nghiệm: Đối với nấm men, tiến hành cấy hoạt hóa trên môi trường thạch SDA, ủ 37ºC trong 48 giờ. Phân tán nấm men vào nước muối sinh lý có 0,05% Tween 80. Điều chỉnh mật độ đến OD530 = 0,08-0,12, tương đương 1-5 x 10^6 CFU/mL. Đối với vi khuẩn, tiến hành cấy hoạt hóa vi khuẩn trên môi trường thạch TSA, ủ 37ºC trong 24 giờ. Cấy chuyển vi khuẩn vào môi trường TSB

trong khoảng 5 giờ. Điều chỉnh mật độ vi khuẩn đến OD625 = 0,08-0,12, tương đương 1-5 x 10^8 CFU/mL. Dùng que bông vô khuẩn trải huyền dịch vi khuẩn, nấm men lên bề mặt thạch, để khô mặt thạch. Dùng 1 ống đồng vô khuẩn đường kính 6 mm đục lỗ trên môi trường đã trải vi sinh vật, cho vào từng giếng 25 µL mẫu thử ở các nồng độ khác nhau. Ủ các đĩa ở 37ºC trong 48 giờ đối với nấm men và 24 giờ đối với vi khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm men được đánh giá bằng cách đo đường kính vòng ức chế vi khuẩn và nấm men (mm). Thử nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình. Gentamicin được sử dụng làm chứng dương đối với vi khuẩn và fluconazole được sử dụng làm chứng dương đối với nấm men. Dung môi hòa tan mẫu được sử dụng làm chứng âm.

Phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng: Chuẩn bị vi sinh vật thử nghiệm tương tự phương pháp khuếch tán. Chuẩn bị dung dịch thử: hòa tan mẫu thử ở các nồng độ mẫu khác nhau. Mỗi nồng độ hút 100 µL chất thử phối hợp với 900 µL môi trường chứa vi sinh vật ở nồng độ 10^6 CFU/mL trong ống nghiệm. Thực hiện song song mẫu chứng âm chứa 1 mL môi trường và chứng dương chứa 1 mL môi trường có vi sinh vật. Ủ 37ºC từ 24-48 giờ, đọc kết quả. MIC là nồng độ thấp nhất của chất thử ức chế sự phát triển vi khuẩn và nấm men quan sát được bằng mắt thường.

2.3.6. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư in vitro

Hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào được đánh giá bằng phép thử MTT, dựa trên khả năng khử muối tetrazolium (MTT) thành tinh thể formazan bởi tế bào sống. Quy trình được thực hiện theo mô tả của Nguyen et al. [173], với một số điều chỉnh phù hợp với điều kiện thí nghiệm.

Mười dòng tế bào được sử dụng gồm: MCF-7 (ung thư vú dương tính thụ thể estrogen, ER+), T47D (ung thư vú phụ thuộc nội tiết), ZR-75-1 (ER+), SKBR3 (HER2+), BT474 (HER2+), BT20 (ER-/PR-), MDAMB231 và MDAMB468 (thể bộ ba âm tính -TNBC, ác tính cao), MCF-10A (tế bào biểu mô vú bình thường, đối chứng âm), và BxPC-3 (ung thư tụy tuyến). Tất cả các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, hỗn hợp kháng sinh 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin và 2 mM L-glutamine. Dòng tế bào MCF-10A được nuôi cấy trong môi trường DMEM:F12 (1:1), bổ sung 5% huyết thanh ngựa bất hoạt nhiệt, 50 IU/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), 2 mM L-glutamine, 20 ng/mL yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF),

500 ng/mL hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin và 10 µg/mL insulin. Tế bào được nuôi lặp lại ba lần trong 100 µL môi trường DMEM trên đĩa 96 giếng, với mật độ 2500-4000 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, khi tế bào đạt pha tăng trưởng lôgarit, môi trường không chứa mẫu (đối chứng) và môi trường có chứa dịch chiết phối hợp PTR và PA (100 µL, tỷ lệ khối lượng 1:1) được thêm vào mỗi giếng để đạt nồng độ cuối cùng 100 µg/mL (ngày 0).

Phép thử MTT được sử dụng, trong đó độ hấp thụ được đo tại 540 nm nhằm xác định mức độ ức chế tăng trưởng tế bào sau 72 giờ ủ, dựa trên sự khác biệt giữa giá trị mật độ quang học tại ngày 0 và thời điểm kết thúc xử lý mẫu. Mức độ ức chế tăng trưởng tế bào được biểu thị dưới dạng phần trăm, giá trị 100% biểu thị sự ức chế tăng trưởng hoàn toàn, giá trị >100% cho thấy không chỉ ức chế tăng trưởng mà còn gây chết tế bào.

2.3.7. Phân tích thống kê

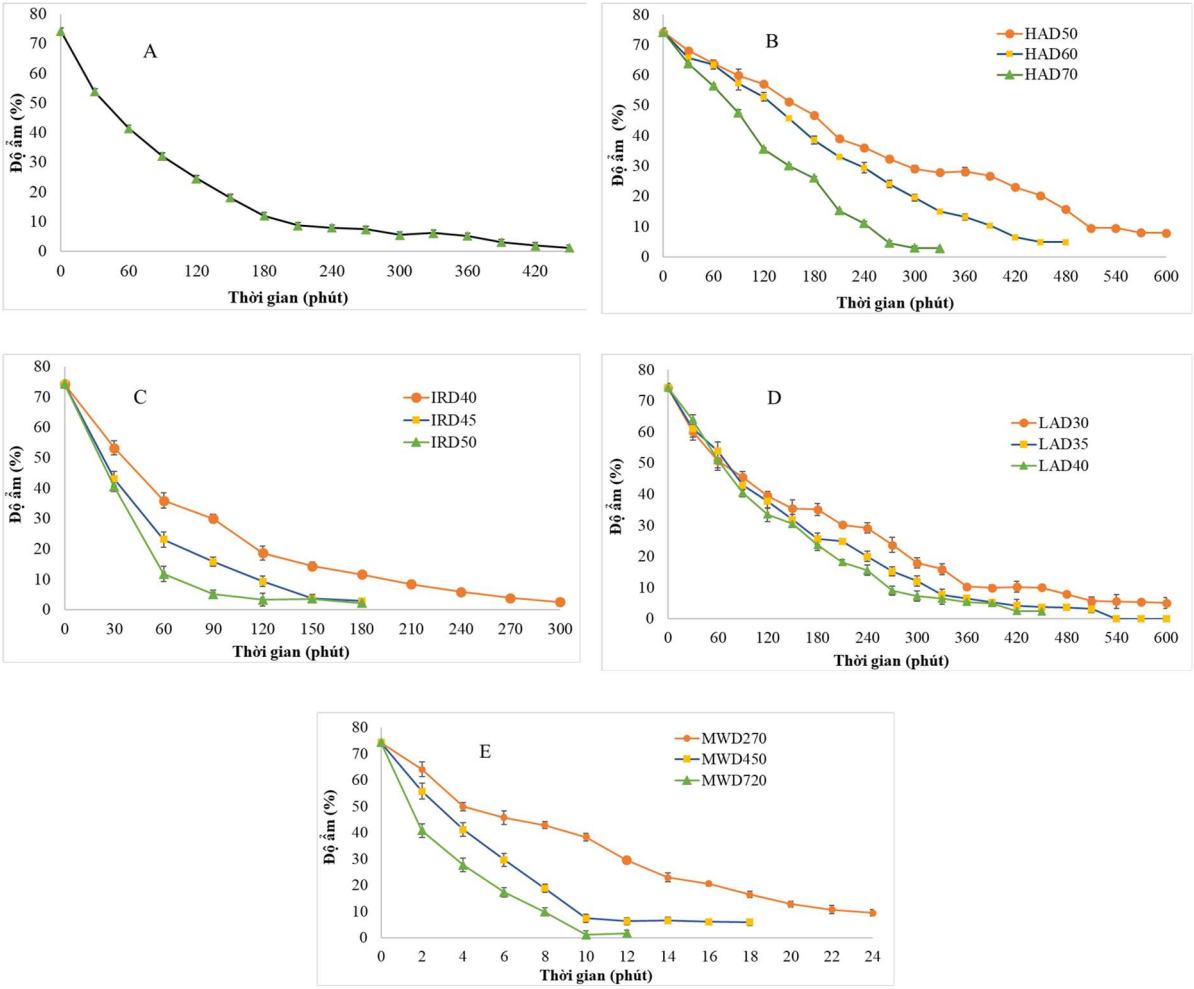
Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện lặp lại 3 lần. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình 3 lần lặp ± độ lệch chuẩn (n=3). Sử dụng phần mềm IBM SPSS Statistics 22 để xử lý số liệu số liệu với mức ý nghĩa nhỏ hơn 0,05 ($p < 0,05$). Sự khác biệt giữa các thí nghiệm được xác định bằng phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) và kiểm định Duncan. Thiết kế thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken, đánh giá các hệ số hồi quy ở mức ý nghĩa thống kê là $p < 0,05$ và vẽ bề mặt đáp ứng để xác định điều kiện chiết tối ưu bằng phần mềm JMP.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu điều kiện sấy

3.1.1.1. Nghiên cứu điều kiện sấy rễ ĐS

3.1.1.2. Đường cong sấy rễ ĐS bằng các phương pháp và điều kiện sấy khác nhau



Hình 3. 1. Đường cong sấy rễ ĐS bằng các điều kiện sấy khác nhau

A: Phơi, B: Sấy không khí nóng, C: Sấy hồng ngoại, D: Sấy lạnh, E: Sấy vi sóng

Hình 3.1 thể hiện đường cong sấy của rễ ĐS ở các phương pháp và điều kiện sấy khác nhau. Nhìn chung, độ ẩm của nguyên liệu giảm dần theo thời gian sấy; nhiệt độ hoặc công suất sấy càng cao thì độ dốc của đường cong càng lớn, thời gian đạt độ ẩm cân bằng càng ngắn và giá trị độ ẩm cân bằng đạt được càng thấp. Điều này cho thấy tốc độ thoát ẩm tăng lên khi chênh lệch áp suất hơi giữa vật liệu và môi trường sấy lớn hơn. Các kết quả thu được tuân theo quy luật đặc trưng của quá trình sấy vật liệu sinh học, bao gồm giai đoạn làm nóng ban đầu, giai đoạn tốc độ sấy giảm dần và tiến tới trạng thái cân bằng ẩm [19].

Hình 3.1A cho thấy quá trình phơi kéo dài tới khoảng 450 phút. Điều này có thể được giải thích do cơ chế truyền nhiệt chủ yếu dựa vào bức xạ mặt trời kết hợp với đối lưu tự nhiên, với cường độ không ổn định theo thời gian trong ngày. Sự dao động nhiệt độ môi trường làm giảm chênh lệch áp suất hơi giữa vật liệu và không khí, dẫn đến tốc độ bay hơi thấp và kéo dài thời gian sấy.

Hình 3.1B cho thấy thời gian sấy không khí nóng ở 50 °C (khoảng 600 phút) cao hơn đáng kể so với các nhiệt độ 60 °C và 70 °C. Ở nhiệt độ thấp, gradient nhiệt và gradient ẩm giữa vật liệu và môi trường nhỏ, làm giảm động lực khuếch tán ẩm từ bên trong ra bề mặt. Ngoài ra, sự co rút cấu trúc trong quá trình sấy có thể làm giảm độ xốp và cản trở khuếch tán nội, do đó kéo dài thời gian sấy.

Ngược lại, Hình 3.1C cho thấy sấy hồng ngoại giúp rút ngắn thời gian sấy hơn so với phơi và sấy không khí nóng. Cơ chế gia nhiệt trực tiếp bằng năng lượng bức xạ điện từ thông qua sự kích thích dao động của các phân tử nước, làm tăng nhanh nhiệt độ bề mặt và vùng gần bề mặt, từ đó thúc đẩy quá trình bay hơi ẩm. Tuy nhiên, do khả năng đâm xuyên hạn chế, hiệu quả sấy phụ thuộc vào độ dày vật liệu và chủ yếu cải thiện giai đoạn đầu của quá trình sấy.

Tuy nhiên, Hình 3.1D cho thấy sấy lạnh có thời gian sấy dài nhất trong các phương pháp khảo sát. Mặc dù môi trường không khí khô đối lưu giúp tăng khả năng mang ẩm, nhưng nhiệt độ sấy thấp làm giảm tốc độ khuếch tán ẩm và kéo dài thời gian xử lý. Điều này không chỉ làm tăng chi phí năng lượng mà còn có thể tạo điều kiện cho các biến đổi oxy hóa và sinh hóa xảy ra trong thời gian sấy kéo dài.

Hình 3.1E chứng minh ưu thế rõ rệt của sấy vi sóng là thời gian sấy ngắn nhất. Cơ chế gia nhiệt điện môi cho phép năng lượng được hấp thụ trực tiếp bởi các phân tử nước trong vật liệu, tạo gia nhiệt thể tích và làm tăng nhanh áp suất nội bào. Sự chênh lệch áp suất giữa bên trong và bề mặt thúc đẩy quá trình thoát ẩm mạnh mẽ, đồng thời phá vỡ cấu trúc tế bào, giúp tăng tốc độ sấy. Trong đó, mẫu MWD720 đạt độ ẩm cuối cùng thấp nhất, cho thấy hiệu quả gia nhiệt và tách ẩm vượt trội ở công suất này.

Tóm lại, các điều kiện sấy khác nhau dẫn đến sự khác biệt rõ rệt về tốc độ thoát ẩm, thời gian sấy và độ ẩm cuối cùng của rễ ĐS. Trong đó, sấy vi sóng (đặc biệt ở công suất 720 W) cho thời gian sấy ngắn nhất và đạt độ ẩm cuối cùng thấp hơn so với các phương pháp khác.

Việc rút ngắn thời gian xử lý góp phần hạn chế sự tiếp xúc kéo dài với oxy và nhiệt, từ đó giảm thiểu các phản ứng oxy hóa và phân hủy, giúp bảo toàn tốt hơn các hợp chất có hoạt tính sinh học.

3.1.1.3. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến tính chất hóa lý rễ ĐS

a. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến màu sắc của rễ ĐS

Màu sắc là chỉ tiêu cảm quan quan trọng, phản ánh trực tiếp những biến đổi hóa lý của các hợp chất sắc tố trong quá trình sấy. Bảng 3.1 cho thấy phương pháp sấy ảnh hưởng rõ rệt đến các thông số màu sắc (L*, a*, b*) và tổng độ lệch màu (ΔE) của rễ ĐS.

Bảng 3. 1. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến màu sắc của rễ ĐS sấy khô

Điều kiện sấy	L* (Độ sáng)	a* (Đỏ/xanh lục)	b* (Vàng/xanh lam)	ΔE (Tổng chênh lệch màu)
SU	29,74±0,69^{gh}	6,02±0,55^{def}	15,35±0,76^{fg}	13,04±0,81^{fgh}
HAD50	27,89±0,75^{i}	5,87±0,28^{ef}	14,53±0,35^{gh}	11,07±0,68^{ik}
HAD60	28,68±1,02^{hi}	5,86±0,44^{ef}	14,16±1,11^{h}	11,62±1,68^{hik}
HAD70	30,58±1,04^{efg}	7,21±1,08^{bcde}	16,12±0,28^{ef}	13,85±0,19^{efg}
IRD40	28,05±0,83^{i}	6,09±0,61^{cdef}	**13,77±0,81^{h}**	**10,82±0,42^{k}**
IRD45	31,23±0,33^{def}	**8,99±0,48^{a}**	16,41±0,42^{def}	14,43±1,25^{ef}
IRD50	29,92±0,18^{fgh}	7,26±1,00^{bcd}	15,44±0,70^{fg}	13,00±1,22^{fgh}
MWD270	36,46±1,18^{c}	**5,54±0,55^{f}**	17,91±0,57^{c}	20,07± 0,48^{c}
MWD450	32,09±1,00^{d}	**5,5±0,82^{f}**	17,53±0,41^{cd}	16,21±0,87^{d}
MWD720	**39,98±0,29^{b}**	**7,79±0,94^{ab}**	**22,76±0,36^{a}**	**25,28±1,08^{b}**
LAD30	30,00±0,94^{fgh}	6,93±0,36^{bcde}	15,30±0,56^{fg}	13,00±0,33^{fgh}
LAD35	31,87±0,60^{de}	7,39±1,19^{bc}	16,44±0,68^{def}	15,18±2,51^{de}
LAD40	28,64±0,14^{hi}	8,1±0,68^{ab}	16,83±0,55^{cde}	12,59±2,80^{ghi}
FRD	**57,09±0,26^{a}**	7,22±0,69^{bcde}	19,39±0,51^{b}	**39,76±0,36^{a}**
FS	**18,75±0,84^{k}**	**8,99±0,10^{a}**	**9,17±0,76^{i}**	**0,00^{i}**

Các chữ viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Về độ sáng (L*): Phương pháp sấy đông khô (FRD) cho giá trị cao nhất (57,09), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với tất cả các phương pháp sấy nhiệt khác. Kết quả này phù hợp với cơ chế của sấy đông khô, trong đó nước được loại bỏ chủ yếu bằng thăng hoa dưới điều kiện nhiệt độ thấp và áp suất thấp. Do nhiệt lượng chủ yếu

được sử dụng để chuyển pha nước đá thành hơi, thay vì làm nóng vật liệu đến nhiệt độ cao, nên các phản ứng sẫm màu như oxy hóa sắc tố, Maillard và caramel hóa bị hạn chế mạnh [51]. Đồng thời, cấu trúc xốp hình thành sau thăng hoa làm bột có khả năng phản xạ ánh sáng tốt hơn, nên sản phẩm thu được có màu sáng hơn rõ rệt. Các mẫu MWD có độ sáng thấp hơn FRD, nhưng vẫn sáng hơn so với đa số phương pháp sấy đối lưu, do thời gian sấy ngắn làm giảm tiếp xúc với oxy. Ngược lại, các mẫu HAD50 và IRD40 có giá trị L* thấp nhất, cho thấy sự tối màu rõ rệt, phản ánh hiện tượng sẫm màu do tác động kéo dài của nhiệt độ và oxy hóa.

Về sắc đỏ (a*): các mẫu IRD45 và MWD720 cho giá trị cao nhất và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu tươi (a* = 8,99), cho thấy sắc đỏ đặc trưng của rễ ĐS được bảo toàn tốt. Đối với MWD720, cơ chế gia nhiệt điện môi cho phép năng lượng vi sóng được hấp thụ trực tiếp bởi các phân tử nước trong vật liệu, tạo gia nhiệt thể tích và rút ngắn đáng kể thời gian sấy. Nhờ đó, thời gian tiếp xúc của sắc tố với oxy và nhiệt được giảm xuống, góp phần hạn chế sự oxy hóa các hợp chất tạo màu đỏ, đặc biệt là nhóm diterpenoid tanshinone. Đối với IRD45, bức xạ hồng ngoại cung cấp nhiệt trực tiếp cho vật liệu với tốc độ nhanh hơn sấy đối lưu, đủ để đẩy nhanh quá trình tách ẩm nhưng chưa gây tác động nhiệt quá mạnh, nên vẫn bảo toàn tương đối tốt sắc đỏ. Ngược lại, các mẫu MWD270 và MWD450 có giá trị a* thấp nhất, cho thấy sự suy giảm sắc đỏ rõ rệt. Mặc dù cùng sử dụng cơ chế gia nhiệt điện môi, nhưng ở công suất thấp hơn, thời gian sấy kéo dài hơn, làm tăng tổng thời gian các hợp chất màu tiếp xúc với oxy và nhiệt, từ đó thúc đẩy quá trình oxy hóa và phân hủy các dẫn xuất tanshinone, làm giảm cường độ sắc đỏ tổng thể.

Đối với sắc vàng (b*), tất cả các mẫu sau sấy đều có giá trị cao hơn mẫu tươi (9,17), cho thấy sắc vàng được biểu hiện rõ hơn sau quá trình xử lý. Trong đó, MWD720 có giá trị b* cao nhất (22,76). Kết quả này có thể liên quan đến cơ chế gia nhiệt nhanh từ bên trong của vi sóng, làm tăng áp suất nội bào, phá vỡ cấu trúc mô và thúc đẩy giải phóng các hợp chất màu ra bề mặt vật liệu, từ đó làm sắc vàng biểu hiện rõ hơn. Đồng thời, sự mất nước nhanh cũng làm tăng nồng độ biểu kiến của các sắc tố trên đơn vị khối lượng sản phẩm khô. Ngược lại, mẫu IRD30 có giá trị b* thấp nhất (13,77), gần với mẫu tươi hơn. Do ở mức nhiệt thấp, năng lượng bức xạ cung cấp chưa đủ mạnh để làm biến đổi sâu cấu trúc mô hoặc thúc đẩy mạnh sự giải phóng sắc tố, nên mức thay đổi sắc vàng thấp hơn so với các phương pháp khác.

Tổng độ khác biệt màu sắc (ΔE) của mẫu FRD lớn nhất (39,76). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, sự khác biệt lớn này chủ yếu đến từ việc gia tăng mạnh giá trị L*, tức là sản phẩm trở nên sáng hơn rõ rệt chứ không phải theo hướng sẫm màu bất lợi. Tiếp theo là Mẫu MWD720 cũng có ΔE cao, cho thấy vi sóng cường độ cao không chỉ rút ngắn thời gian sấy mà còn làm thay đổi mạnh trạng thái biểu hiện màu sắc, đặc biệt theo hướng tăng sắc vàng và duy trì tương đối tốt sắc đỏ. Ngược lại, mẫu IRD40 có ΔE thấp nhất (10,82), nghĩa là màu sắc gần với mẫu tươi nhất. Kết quả này có thể được giải thích bởi cơ chế gia nhiệt bức xạ ở mức nhiệt thấp, làm quá trình biến đổi sắc tố diễn ra chậm hơn, đồng thời hạn chế mức độ thay đổi tổng thể về màu sắc.

b. Ảnh hưởng của các phương pháp và điều kiện sấy đến tính chất hóa lý rễ ĐS

Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.2.

- Thời gian sấy: Thời gian sấy có sự khác biệt rõ rệt giữa các phương pháp, dao động từ 0,3 đến 48 giờ. Sự khác biệt về thời gian sấy chủ yếu xuất phát từ cơ chế truyền nhiệt của từng phương pháp. Sấy vi sóng (MWD) có thời gian ngắn nhất (0,30–0,95 giờ) do cơ chế gia nhiệt điện môi, năng lượng tạo ra bởi sóng điện từ được hấp thụ trực tiếp bởi nước trong vật liệu, tạo gia nhiệt thể tích và tăng áp suất nội bào, thúc đẩy thoát ẩm nhanh. Sấy hồng ngoại (IRD) nhanh thứ hai (2,3–5,0 giờ) do năng lượng bức xạ điện từ tác động trực tiếp vào vật liệu thông qua sự kích thích dao động của các phân tử nước. Ngược lại, HAD, LAD và SU kéo dài thời gian hơn do cơ chế truyền nhiệt bằng đối lưu từ ngoài vào trong chậm hơn. Sấy đông khô mất nhiều thời gian nhất (48 giờ), do ẩm phải thăng hoa từ trạng thái rắn sang hơi trong điều kiện áp suất thấp. Nhìn chung, thời gian sấy kéo dài không chỉ tăng chi phí mà còn làm tăng nguy cơ oxy hóa và suy giảm chất lượng dược liệu.

- Tiêu thụ năng lượng: Mức tiêu thụ điện năng tỷ lệ thuận với thời gian sấy, thời gian sấy càng dài thì điện năng tiêu thụ càng lớn. Ngoại trừ phơi nắng (SD) sử dụng năng lượng tự nhiên nên không tiêu thụ điện năng, tất cả các phương pháp còn lại đều cần sử dụng năng lượng điện. Trong các phương pháp khảo sát, sấy vi sóng tiêu thụ năng lượng thấp nhất (0,19-0,26 kWh), nhờ thời gian xử lý ngắn và khả năng gia nhiệt trực tiếp lên phân tử nước, giúp hạn chế thất thoát năng lượng ra môi trường. Sấy không khí nóng (7,00-12,60 kWh) và sấy lạnh (15,77-19,00 kWh) tiêu thụ năng lượng cao hơn do do hiệu suất truyền nhiệt thấp và thời gian kéo dài. Sấy đông khô là phương pháp tiêu tốn năng lượng nhiều nhất, lên tới 105,6 kWh, do phải trải qua nhiều giai đoạn tiêu thụ

năng lượng lớn (đông lạnh nguyên liệu, duy trì áp suất chân không và cung cấp năng lượng cho quá trình thăng hoa). Đây là hạn chế lớn nhất của phương pháp này khi xem xét khả năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp.

- Độ ẩm: Kết quả cho thấy mẫu MWD720 và FRD có độ ẩm thấp nhất (3,77% và 4,38%), phản ánh hiệu suất tách ẩm cao của hai phương pháp này - MWD nhờ áp suất nội bào thúc đẩy thoát ẩm mạnh, còn FRD nhờ loại ẩm triệt để bằng thăng hoa. Các phương pháp còn lại có độ ẩm dao động từ 6,33-11,35%, chủ yếu do tốc độ khử nước chậm hoặc cơ chế truyền nhiệt – truyền khối kém hiệu quả hơn, khiến mẫu khó đạt đến độ ẩm cân bằng thấp. Ngoài ra, độ ẩm có xu hướng giảm khi nhiệt độ hoặc công suất sấy tăng, phù hợp với cơ chế khuếch tán ẩm mạnh hơn ở điều kiện năng lượng cao.

- Hoạt độ nước (a_w): Mẫu tươi có hoạt độ nước cao nhất (0,93) thuận lợi cho vi sinh vật và enzyme hoạt động mạnh, không thể bảo quản ở điều kiện thường. Tất cả các phương pháp đều đưa mẫu về trạng thái an toàn với $a_w < 0,65$, giúp ức chế vi sinh vật và enzyme để kéo dài thời gian bảo quản [81]. Các phương pháp gia nhiệt nhanh (MWD, IRD) làm giảm a_w mạnh hơn so với các phương pháp có thời gian kéo dài (HAD, LAD, SD), Ngoài ra, giá trị aw giảm theo mức năng lượng sấy, phù hợp với cơ chế tăng cường khuếch tán ẩm ở điều kiện năng lượng cao.

- **Năng suất sấy (DY):** Kết quả cho thấy năng suất sấy có xu hướng giảm khi nhiệt độ hoặc công suất sấy tăng. Mẫu SD có DY cao nhất (55,41 g/100 g mẫu tươi), tiếp theo là sấy lạnh LAD30 (45,58 g/100 g mẫu tươi), phản ánh quá trình tách ẩm diễn ra chậm, độ ẩm cuối cùng còn tương đối cao. Ngược lại, mẫu HAD70 cho DY thấp nhất (20,04 g/100 g mẫu tươi), do nhiệt độ sấy cao thúc đẩy quá trình thoát ẩm mạnh, làm giảm đáng kể khối lượng mẫu khô còn lại.

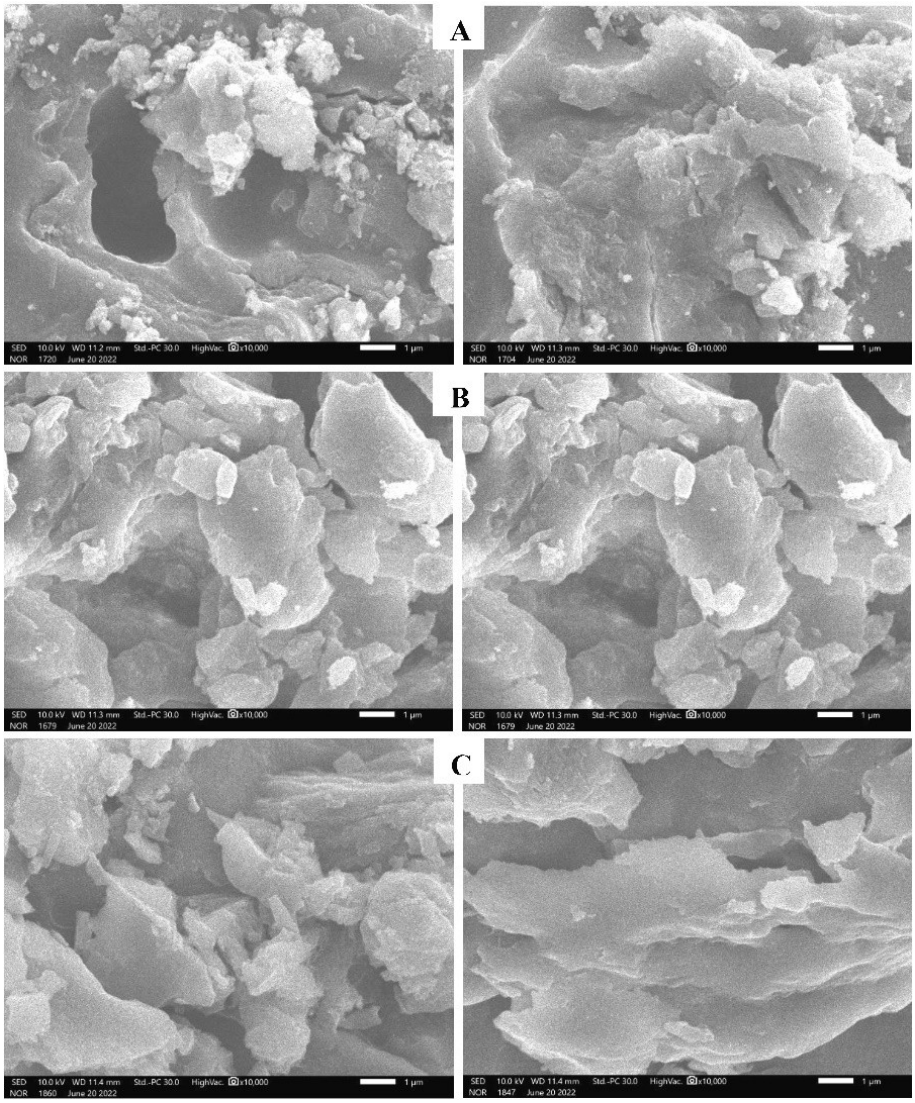
- Năng suất chiết (EY): EY chịu ảnh hưởng trực tiếp từ mức độ phá vỡ cấu trúc do cơ chế gia nhiệt. MWD, đặc biệt MWD720, tạo áp suất nội bào cao và phá vỡ mạnh cấu trúc tế bào, giúp dung môi dễ xâm nhập và giải phóng hoạt chất, nên EY cao hơn. Ngược lại, IRD và HAD với cơ chế gia nhiệt từ ngoài vào trong làm cấu trúc ít bị phá vỡ hơn, hạn chế khả năng chiết.

Bảng 3. 2. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của rễ ĐS

Phương pháp sấy	Thời gian sấy (h)	Độ ẩm (%)	Hoạt độ nước (a_w)	Tiêu thụ năng lượng (KWh)	Năng suất sấy (g mẫu khô/ 100 g mẫu tươi)	Năng suất chiết (g dịch chiết khô/ 100 g DM)
SD	8,3	$7,53 \pm 0,11^{c}$	$0,63 \pm 0,03^{b}$	**0,00**	**$55,41 \pm 0,16^{a}$**	$18,03 \pm 1,25^{cde}$
HAD50	9,0	$11,35 \pm 0,74^{b}$	$0,64 \pm 0,02^{b}$	12,60	$31,92 \pm 0,32^{g}$	$15,79 \pm 1,30^{def}$
HAD60	7,5	$7,30 \pm 0,18^{c}$	$0,56 \pm 0,01^{d}$	10,50	$22,34 \pm 0,01^{m}$	$12,94 \pm 1,25^{fg}$
HAD70	5,0	$6,33 \pm 0,35^{c}$	$0,51 \pm 0,03^{fg}$	7,00	**$20,04 \pm 0,01^{n}$**	$14,24 \pm 1,23^{ef}$
IRD40	5,0	$7,63 \pm 0,47^{c}$	$0,53 \pm 0,01^{ef}$	9,00	$27,11 \pm 0,01^{k}$	$16,60 \pm 1,25^{def}$
IRD45	3,0	$7,33 \pm 1,96^{c}$	$0,52 \pm 0,02^{efg}$	5,40	$24,75 \pm 0,02^{l}$	$15,83 \pm 1,25^{def}$
IRD50	2,3	$6,73 \pm 0,58^{c}$	$0,51 \pm 0,01^{fg}$	4,14	$27,44 \pm 0,03^{i}$	$8,58 \pm 1,24^{h}$
MWD270	0,95	$10,07 \pm 0,50^{b}$	$0,59 \pm 0,02^{cd}$	0,26	$34,95 \pm 0,01^{c}$	$21,50 \pm 1,28^{bc}$
MWD450	0,43	$6,04 \pm 1,96^{c}$	$0,51 \pm 0,02^{fg}$	0,19	$34,45 \pm 0,15^{d}$	$23,41 \pm 1,23^{b}$
MWD720	**0,3**	**$3,77 \pm 1,55^{d}$**	**$0,48 \pm 0,04^{g}$**	**0,22**	$32,47 \pm 0,06^{f}$	**$24,25 \pm 1,20^{b}$**
LAD30	10,0	$9,64 \pm 0,29^{b}$	$0,59 \pm 0,02^{cd}$	19,00	$45,58 \pm 1,06^{b}$	$10,33 \pm 1,28^{gh}$
LAD35	9,0	$10,33 \pm 0,40^{b}$	$0,61 \pm 0,02^{bc}$	17,10	$30,05 \pm 0,01^{h}$	$15,61 \pm 1,29^{def}$
LAD40	8,3	$10,34 \pm 1,12^{b}$	$0,55 \pm 0,01^{de}$	15,77	$33,23 \pm 0,01^{e}$	$18,59 \pm 1,29^{cd}$
FRD	**48**	**$4,38 \pm 0,00^{d}$**	**$0,42 \pm 0,00^{h}$**	**105,60**	ND	$13,94 \pm 1,21^{f}$
FS	0	$74,25 \pm 1,25^{a}$	$0,93 \pm 0,00^{a}$	ND	ND	**$44,00 \pm 4,48^{a}$**

Các chữ viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Phơi nắng: SD; sấy không khí ở 50 °C, 60 °C, 70 °C: HAD50/60/70; sấy hồng ngoại ở 40 °C, 45 °C, 50 °C: IRD40/45/50; sấy vi sóng ở 270W, 450W, 720W: MWD270/450/720; sấy lạnh ở 30 °C, 35 °C, 40 °C: LAD30/35/40; sấy đông khô: FRD; không xác định: ND

- Cấu trúc bề mặt: Hình 3.2 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về hình thái bề mặt của rễ ĐS sau sấy bằng ba mức công suất vi sóng khác nhau, phản ánh trực tiếp mức độ gia nhiệt điện môi và áp suất nội bào tạo ra trong quá trình sấy. Ở công suất thấp (MWD270), năng lượng cung cấp chưa đủ lớn để tạo áp suất nội bào mạnh, do đó cấu trúc tế bào chỉ bị biến dạng nhẹ, bề mặt còn tương đối nguyên vẹn và độ xốp thấp. Khi tăng lên MWD450, mức độ gia nhiệt tăng làm áp suất nội bào lớn hơn, gây phá vỡ một phần cấu trúc mô, hình thành các khe nứt và lỗ rỗng nhỏ, từ đó cải thiện khả năng khuếch tán ẩm và dung môi. Ở công suất cao (MWD720), gia nhiệt thể tích diễn ra mạnh, làm tăng nhanh áp suất nội bào và gây phá vỡ cấu trúc tế bào rõ rệt, tạo hệ mao quản xốp và bề mặt phân mảnh. Cấu trúc này làm giảm trở lực khuếch tán, tăng diện tích tiếp xúc và tạo điều kiện thuận lợi cho dung môi xâm nhập, do đó liên quan trực tiếp đến giá trị EY, TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn so với các mức công suất thấp.



Hình 3. 2 Hình ảnh SEM của 3 mẫu MWD270 (A), MWD450 (B), MWD720 (C)

Tóm lại, kết quả cho thấy mẫu MWD720 có nhiều ưu điểm nổi bật so với các phương pháp sấy khác: màu sắc ít biến đổi, thời gian sấy ngắn nhất, năng suất chiết cao, hoạt độ nước thấp, mức tiêu thụ năng lượng nhỏ và năng suất sấy không chênh lệch đáng kể so với các phương pháp truyền thống. Do đó, xét trên các chỉ tiêu hóa lý then chốt, sấy vi sóng ở 720 W là phương pháp phù hợp nhất để làm khô rễ ĐS, tạo tiền đề thuận lợi cho việc bảo toàn và thu hồi các hoạt chất sinh học trong các bước đánh giá tiếp theo.

c. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến hàm lượng các hoạt chất sinh học của rễ ĐS

Bảng 3. 3. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hàm lượng hoạt chất sinh học rễ ĐS

Điều kiện sấy	TSC (mg EE/g DM)	TPC (mg GAE/g DM)	TFC (mg CE/g DM)	TAC (mg AE/g DM)
SD	$20,68 \pm 0,86^{d}$	$2,98 \pm 0,13^{k}$	$0,75 \pm 0,12^{d}$	$3,95 \pm 0,72^{hi}$
HAD50	$21,27 \pm 1,16^{d}$	$4,28 \pm 0,02^{ghi}$	$0,58 \pm 0,04^{def}$	$3,39 \pm 0,11^{i}$
HAD60	$24,85 \pm 0,74^{c}$	$5,73 \pm 0,30^{f}$	$0,68 \pm 0,03^{de}$	$3,62 \pm 0,58^{hi}$
HAD70	$27,00 \pm 2,43^{c}$	$8,16 \pm 0,41^{e}$	$0,52 \pm 0,03^{efg}$	$4,22 \pm 0,60^{ghi}$
IRD40	$19,17 \pm 1,32^{de}$	$2,87 \pm 0,28^{k}$	$0,37 \pm 0,01^{g}$	$4,33 \pm 0,53^{fghi}$
IRD45	$19,60 \pm 1,00^{de}$	$3,52 \pm 0,10^{hik}$	$0,58 \pm 0,03^{def}$	$5,21 \pm 0,70^{fg}$
IRD50	$27,22 \pm 3,34^{c}$	$4,67 \pm 0,06^{fgh}$	$1,93 \pm 0,16^{b}$	$5,37 \pm 0,48^{f}$
MWD270	$12,89 \pm 1,17^{f}$	$4,98 \pm 0,40^{fg}$	$0,68 \pm 0,07^{de}$	$11,63 \pm 0,71^{d}$
MWD450	$18,01 \pm 1,68^{de}$	$13,05 \pm 1,68^{c}$	$1,99 \pm 0,23^{b}$	$12,21 \pm 0,55^{cd}$
MWD720	**$32,00 \pm 3,05^{b}$**	**$9,33 \pm 0,14^{d}$**	**$1,26 \pm 0,02^{c}$**	**$13,16 \pm 0,31^{c}$**
LAD30	$16,68 \pm 0,48^{e}$	$3,09 \pm 0,53^{ik}$	$0,40 \pm 0,04^{fg}$	$4,52 \pm 0,83^{fgh}$
LAD35	$21,34 \pm 1,56^{d}$	$3,78 \pm 0,27^{ghik}$	$0,44 \pm 0,03^{fg}$	$5,22 \pm 0,71^{fg}$
LAD40	$19,28 \pm 1,91^{de}$	$3,88 \pm 0,08^{ghik}$	$0,57 \pm 0,02^{def}$	$6,58 \pm 0,54^{e}$
FRD	**$33,66 \pm 3,49^{b}$**	**$16,68 \pm 0,27^{b}$**	**$2,32 \pm 0,12^{a}$**	**$16,52 \pm 0,23^{b}$**
FS	**$48,76 \pm 1,16^{a}$**	**$21,24 \pm 0,86^{a}$**	**$2,35 \pm 0,24^{a}$**	**$26,10 \pm 0,74^{a}$**

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy hàm lượng saponin tổng số (TSC) của rễ ĐS sau sấy dao động từ 12,89 đến 33,66 mg EE/g DM và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện sấy ($p < 0,05$). Mẫu tươi có TSC cao nhất (48,76 mg EE/g DM), phản ánh hàm lượng tự nhiên trước tác động của quá trình sấy. Trong số các mẫu sau sấy, FRD và MWD720 giữ lại TSC cao nhất (33,66 và 32,00 mg EE/g DM), cao hơn rõ rệt so với

các phương pháp còn lại. Kết quả này có thể giải thích từ cơ chế truyền nhiệt đặc trưng của hai phương pháp. FRD diễn ra ở nhiệt độ thấp và môi trường chân không nên hạn chế quá trình oxy hóa và phân hủy nhiệt, trong khi MWD720 với cơ chế gia nhiệt thể tích làm tăng nhanh áp suất nội bào, phá vỡ cấu trúc mô và giải phóng saponin liên kết trong thành tế bào. Đồng thời, thời gian sấy ngắn cũng góp phần giảm mức độ tiếp xúc oxy. Ngược lại, các phương pháp còn lại làm suy giảm TSC đáng kể, đặc biệt MWD270 cho giá trị thấp nhất (12,89 mg EE/g DM). Kết quả này cho thấy ở mức năng lượng thấp, mặc dù cường độ nhiệt không cao, nhưng thời gian sấy kéo dài làm tăng thời gian tiếp xúc với oxy, từ đó thúc đẩy quá trình oxy hóa và phân giải chậm saponin. Xu hướng TSC tăng theo nhiệt độ hoặc công suất vi sóng cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây trên *Phyllanthus amarus* [176] và *S. spinescens* [164].

Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) của rễ ĐS sau sấy cũng khác biệt rõ rệt theo điều kiện sấy. Mẫu tươi có TPC đạt 21,24 mg GAE/g DM. Trong số các phương pháp sấy, FRD cho TPC cao nhất (16,68 mg GAE/g DM), tiếp theo là MWD450 và MWD720 (13,50 và 9,33 mg GAE/g DM), trong khi các phương pháp còn lại chỉ đạt 2,98–8,16 mg GAE/g DM. Sự suy giảm TPC chủ yếu liên quan đến độ nhạy cao của polyphenol đối với oxy và nhiệt kéo dài [232, 264]. Các phương pháp sấy như HAD, IRD và LAD với thời gian xử lý dài làm tăng tiếp xúc với oxy, thúc đẩy quá trình oxy hóa và phân hủy các hợp chất phenolic. Đối với LAD, mặc dù nhiệt độ thấp, nhưng do thời gian kéo dài, các phản ứng oxy hóa vẫn diễn ra chậm nhưng liên tục, dẫn đến tổn thất polyphenol đáng kể [264]. Ngược lại, FRD và MWD cho giá trị TPC cao hơn do hạn chế được thời gian tiếp xúc oxy và đồng thời hỗ trợ giải phóng các hợp chất phenolic từ cấu trúc tế bào. Tuy nhiên, khi công suất vi sóng quá cao như MWD720, hiện tượng gia nhiệt cục bộ có thể xảy ra, làm tăng phân hủy một phần polyphenol nhạy nhiệt, do đó TPC thấp hơn MWD450. Ngoài ra sự biến đổi TPC còn liên quan đến hoạt động của các enzyme oxy hóa như polyphenoloxidase và peroxidase. Ở nhiệt độ thấp hoặc trung bình, các enzyme này có thể vẫn hoạt động và xúc tác quá trình oxy hóa phenolic; trong khi ở nhiệt độ cao hơn, enzyme bị vô hoạt nhanh, nhưng đồng thời các phản ứng phân hủy nhiệt và oxy hóa phi enzyme lại tăng lên, góp phần làm giảm hàm lượng polyphenol tổng số [294]. Xu hướng này tương tự các nghiên cứu trên gừng [129] và trên vỏ cà rốt [169], mặc dù không hoàn toàn đồng nhất với các loại nguyên liệu khác, như *S. spinescens* ghi nhận TPC cao nhất ở vi sóng công suất thấp (240 W) [164], trong khi ở

bạc hà, sấy đông khô cho TPC cao hơn đáng kể còn sấy vi sóng và sấy đối lưu lại làm giảm mạnh TPC [184].

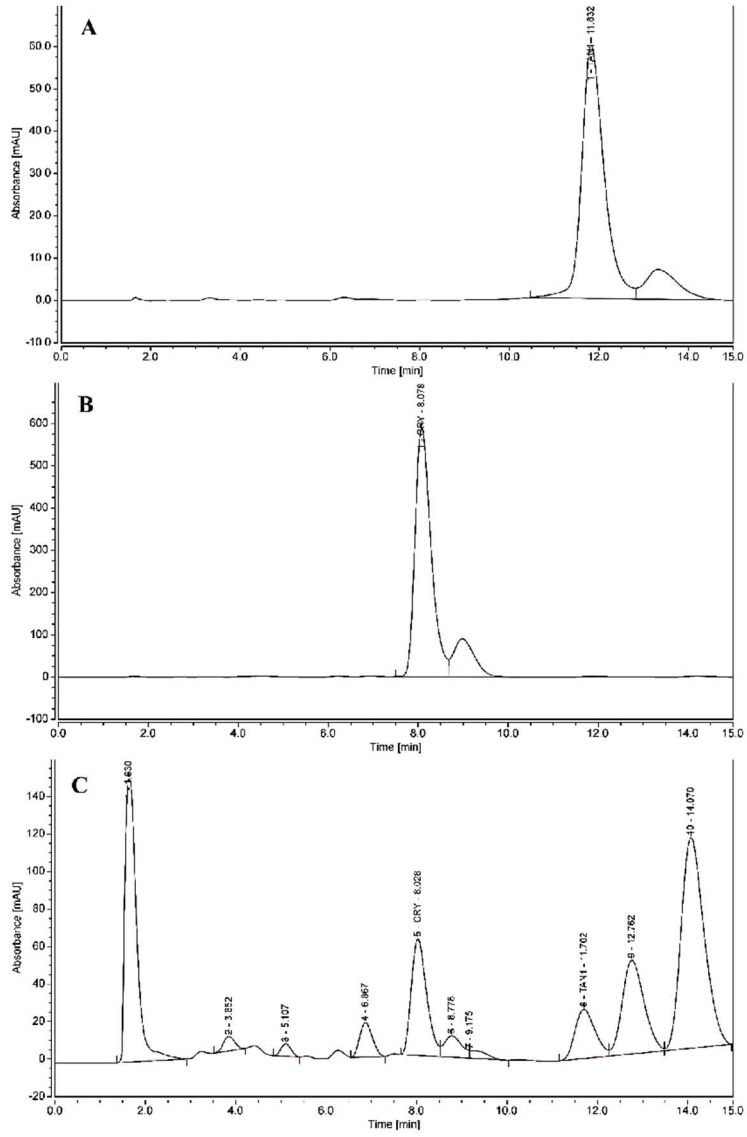
Hàm lượng flavonoid tổng số (TFC) của các mẫu sấy dao động từ 0,37 đến 2,32 mg CE/g DM và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Mẫu tươi đạt 2,35 mg CE/g DM, trong khi FRD giữ lại hàm lượng flavonoid cao nhất (2,32 mg CE/g DM), tiếp theo là MWD450, IRD50 và MWD720 (1,99; 1,93 và 1,26 mg CE/g DM). Xu hướng này tương tự TPC, phản ánh độ nhạy cao của flavonoid với oxy trong điều kiện sấy kéo dài. Ở mẫu IRD50, TFC tương đối cao so với các điều kiện IRD khác có thể là do tia hồng ngoại bước sóng dài có khả năng kích hoạt đứt gãy một số liên kết cộng hóa trị yếu, giải phóng flavonoid và các hợp chất chống oxy hóa khác như polyphenol, tannin hoặc carotenoid [178]. Ngược lại, ở IRD40, LAD30 và LAD35, quá trình sấy kéo dài làm tăng oxy hóa liên tục, dẫn đến TFC thấp nhất (0,37; 0,40 và 0,44 mg CE/g DM).

TAC của rễ ĐS có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện sấy ($p < 0,05$). Mẫu tươi có TAC đạt 26,10 mg AE/g DM, trong khi các mẫu khô chỉ dao động từ 3,39 đến 16,52 mg AE/g DM. Điều này chứng tỏ alkaloid là nhóm hợp chất nhạy cảm với nhiệt và chịu ảnh hưởng mạnh bởi thời gian tiếp xúc nhiệt – oxy trong quá trình sấy. Trong số các phương pháp khảo sát, FRD, MWD720 và MWD450 giữ lại TAC cao nhất (13,16; 12,21 và 11,63 mg AE/g DM), phản ánh lợi thế của nhiệt độ thấp – chân không (FRD) và gia nhiệt nhanh theo cơ chế vi sóng (MWD), giúp hạn chế oxy hóa – phân hủy và đồng thời giải phóng một phần alkaloid ở dạng liên kết trong mô thực vật. Ngược lại, các phương pháp còn lại gây tổn thất lớn (2,98-6,60 mg AE/g DM), chủ yếu do thời gian sấy kéo dài trong môi trường hiếu khí làm tăng phân hủy hợp chất.

Kết quả cũng cho thấy xu hướng gia tăng TAC theo mức năng lượng sấy (tăng nhiệt độ hoặc công suất vi sóng), với điều kiện thời gian xử lý được rút ngắn đủ để hạn chế quá trình oxy hóa kéo dài. Ngược lại, nếu thời gian sấy kéo dài, các quá trình oxy hóa và phân hủy nhiệt sẽ chiếm ưu thế, dẫn đến suy giảm hàm lượng alkaloid. Xu hướng này tương tự với nghiên cứu trên vỏ quả cacao [175], trong đó tăng nhiệt độ trong sấy không khí nóng giúp giải phóng alkaloid từ mô thực vật, qua đó làm tăng TAC.

Hình 3.3 trình bày sắc ký đồ UHPLC của 2 chất chuẩn Tanshinone I và Cryptotanshinone (A and B) cùng với mẫu rễ ĐS được sấy bằng vi sóng ở 720 W (C). Hai hợp chất này được lựa chọn làm chất chỉ thị đại diện cho nhóm diterpen quinone

đặc trưng của ĐS, nhằm bước đầu phản ánh sự hiện diện của các hợp chất đặc trưng trong mẫu. Khi so sánh thời gian lưu giữa sắc ký đồ chuẩn và mẫu nghiên cứu, có thể thấy hai đỉnh trong mẫu khô xuất hiện tương ứng tại 11,83 phút (Tanshinone I) và 8,08 phút (Cryptotanshinone). Điều này chứng tỏ mẫu rễ ĐS sau sấy MWD720 vẫn chứa các hợp chất tanshinone đặc trưng, đồng thời xác nhận tính ổn định cấu trúc và khả năng bảo toàn các hợp chất này dưới điều kiện sấy vi sóng công suất cao.



Hình 3. 3. Sắc ký đồ UHPLC của chuẩn Tanshinone I (A), Cryptotanshinone (B), và mẫu MWD720 (C)

Bảng 3.4 cho thấy sự hiện diện của hai hợp chất Tanshinone I và Cryptotanshinone với hàm lượng đáng kể trong mẫu rễ ĐS sau khi sấy vi sóng ở công suất 720 W. Kết quả này cho thấy phương pháp MWD720 không làm mất hoàn toàn các hợp chất thuộc nhóm tanshinone và có thể góp phần hạn chế biến đổi của chúng trong quá trình sấy.

Bảng 3. 4. Hàm lượng hai hoạt chất sinh học trong rễ ĐS sấy khô bằng MWD720

Mẫu sấy	Hoạt chất	Hàm lượng (mg/g DM)
MWD720	Tanshinone I	6,38 ± 0,05
	Cryptotanshinone	1,55 ± 0,04

Tóm lại, các kết quả cho thấy phương pháp sấy vi sóng ở 720 W là phương pháp bảo tồn được các hoạt chất sinh học (TSC, TPC, TFC và TAC) ở mức tương đối cao, chỉ thấp hơn phương pháp sấy đông khô nhưng vượt trội so với các phương pháp sấy khác. Điều này khẳng định MWD720 là lựa chọn tối ưu về hiệu quả bảo toàn hoạt chất kết hợp với khả năng ứng dụng thực tế trong quy mô sản xuất.

d. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của rễ ĐS

Kết quả ở Bảng 3.5 cho thấy giá trị DRSC của mẫu tươi đạt 26,15 mg TE/g DM. Sau khi sấy, mẫu FRD có DRSC cao nhất, tiếp theo là MWD720 và HAD60. Kết quả này cho thấy các điều kiện sấy có khả năng rút ngắn thời gian xử lý hoặc hạn chế oxy hóa giúp duy trì hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn. Cụ thể, FRD diễn ra ở nhiệt độ thấp và môi trường chân không nên hạn chế phân hủy oxy hóa, trong khi MWD720 với cơ chế gia nhiệt nhanh giúp giảm thời gian tiếp xúc với oxy và hỗ trợ giải phóng các hợp chất chống oxy hóa từ mô thực vật. Ngược lại, mẫu IRD40 ghi nhận giá trị thấp nhất (3,63 mg TE/g DM), cho thấy điều kiện bức xạ hồng ngoại ở mức nhiệt thấp nhưng kéo dài không thuận lợi cho việc duy trì khả năng quét gốc DPPH. Do đặc điểm truyền nhiệt của IRD chủ yếu tập trung ở bề mặt, quá trình tách ẩm diễn ra chậm, làm kéo dài thời gian tiếp xúc với oxy và thúc đẩy quá trình oxy hóa thứ cấp của polyphenol trong suốt thời gian sấy.

ARSC của các mẫu sau sấy dao động từ 6,44 đến 21,70 mg TE/g DM. Mẫu FRD ghi nhận ARSC cao nhất, tiếp theo là MWD450, HAD60 và MWD720, trong khi các mẫu LAD và SD có giá trị thấp nhất. Xu hướng này tương tự DRSC, cho thấy các phương pháp sấy nhanh hoặc hạn chế oxy hóa giúp duy trì hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn còn các phương pháp có thời gian sấy kéo dài làm tăng mức độ oxy hóa, dẫn đến suy giảm khả năng khử gốc ABTS. Kết quả này phù hợp với xu hướng chung cho thấy mối liên hệ tỉ lệ thuận giữa hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) và hoạt tính chống oxy hóa [142, 197]. Giá trị ARSC cao trong các mẫu MWD tương đồng với nghiên cứu trên

vỏ cà rốt [169] và vỏ chuối [251]. Bên cạnh đó, hoạt tính chống oxy hóa có xu hướng tăng khi nhiệt độ hoặc công suất vi sóng tăng, phù hợp với kết quả ghi nhận trên *S. spinescens* [164], *P. amarus* [176] và lá *H. hirsuta* L. [197]. Xu hướng này có thể liên quan đến sự gia tăng mức độ giải phóng các hợp chất chống oxy hóa từ cấu trúc tế bào dưới tác động của năng lượng sấy [92], đồng thời quá trình gia nhiệt nhanh góp phần bất hoạt sớm các enzyme oxy hóa như polyphenol oxidase, qua đó hạn chế sự suy giảm phenolic[128]. Ngoài ra, việc tiếp xúc với oxy ở mức vừa phải có thể thúc đẩy hình thành các dẫn xuất polyphenol bền hơn [263]. Trong một số điều kiện sấy nhiệt, các sản phẩm trung gian của phản ứng Maillard cũng có thể đóng góp vào khả năng cho electron và tăng cường hoạt tính quét gốc tự do [24, 280].

Bảng 3. 5. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của rễ ĐS

Phương pháp sấy	DRSC (mg TE/g DM)	ARSC (mg TE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
SD	$3,97 \pm 0,69^{hi}$	$10,56 \pm 1,10^{gh}$	$7,29 \pm 0,60^{f}$
HAD50	$9,64 \pm 0,59^{ef}$	$13,51 \pm 1,04^{ef}$	$12,14 \pm 0,99^{d}$
HAD60	$12,87 \pm 0,28^{d}$	**$18,14 \pm 0,79^{bc}$**	$12,58 \pm 0,84^{cd}$
HAD70	$8,54 \pm 0,25^{fg}$	$14,10 \pm 1,74^{e}$	$9,24 \pm 0,26^{e}$
IRD40	$3,63 \pm 0,31^{i}$	$12,22 \pm 1,30^{efg}$	$5,29 \pm 0,33^{h}$
IRD45	$5,07 \pm 0,58^{hi}$	$13,92 \pm 1,28^{e}$	$7,29 \pm 0,60^{f}$
IRD50	$9,04 \pm 0,56^{f}$	$15,95 \pm 1,35^{d}$	$13,46 \pm 1,71^{cd}$
MWD270	$9,32 \pm 0,49^{f}$	$13,53 \pm 0,58^{ef}$	$8,96 \pm 0,31^{e}$
MWD450	$11,15 \pm 1,75^{e}$	**$19,61 \pm 0,55^{b}$**	$20,91 \pm 1,76^{b}$
MWD720	**$17,72 \pm 1,32^{c}$**	**$17,89 \pm 1,17^{bc}$**	**$22,76 \pm 0,41^{a}$**
LAD30	$5,34 \pm 0,76^{h}$	$6,44 \pm 0,25^{i}$	$5,44 \pm 0,32^{gh}$
LAD35	$9,52 \pm 0,41^{f}$	$9,64 \pm 1,27^{h}$	$6,35 \pm 0,60^{fgh}$
LAD40	$7,33 \pm 0,52^{g}$	$11,85 \pm 0,11^{fg}$	$7,01 \pm 0,85^{fg}$
FRD	**$22,58 \pm 0,16^{b}$**	**$21,70 \pm 0,79^{a}$**	**$21,83 \pm 0,90^{ab}$**
FS	**$26,15 \pm 1,10^{a}$**	$17,54 \pm 1,05^{cd}$	$14,13 \pm 1,30^{c}$

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong khi đó, các mẫu SD và LAD có ARSC thấp nhất, có thể do thời gian sấy kéo dài làm tăng mức độ oxy hóa các hợp chất chống oxy hóa. Đối với SD, việc tiếp xúc với bức xạ ánh sáng mặt trời (bao gồm tia UV) có thể thúc đẩy quá trình phân hủy các hợp chất phenolic, từ đó làm suy giảm khả năng khử gốc ABTS và dẫn đến giảm đáng

kể hoạt tính chống oxy hóa. Xu hướng này cũng đã được ghi nhận tương tự trong nghiên cứu trên *P. amarus* [176].

Giá trị FRAP của các mẫu sau sấy dao động từ 5,29 đến 22,76 mg TE/g DM. Mẫu MWD720 cho giá trị FRAP cao nhất, tiếp theo là FRD, đều cao hơn đáng kể so với các điều kiện sấy khác và thậm chí vượt mẫu tươi (14,13 mg TE/g DM). Điều này cho thấy ở điều kiện năng lượng cao nhưng thời gian xử lý ngắn, khả năng khử của mẫu được tăng cường do sự giải phóng hiệu quả các hợp chất có khả năng cho electron từ cấu trúc mô thực vật. Các hợp chất này đóng vai trò là chất khử, tham gia chuyển electron để khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} trong hệ phản ứng FRAP, từ đó làm tăng giá trị đo được.

Ngược lại, các mẫu IRD40, LAD, IRD45 và SD ghi nhận FRAP thấp nhất (5,29-7,29 mg TE/g DM), cho thấy ở các điều kiện nhiệt độ thấp kéo dài quá trình oxy hóa chậm nhưng liên tục làm suy giảm đáng kể các chất khử. Xu hướng này vừa tương đồng, vừa khác biệt với một số nghiên cứu trước, tùy thuộc vào bản chất nguyên liệu và trạng thái liên kết của polyphenol trong mô thực vật. Đối với sấy vỏ cà rốt [169] và vỏ chuối [251], mẫu MWD ở công suất cao ghi nhận giá trị FRAP cao nhất, do khả năng phá vỡ vách tế bào và giải phóng các hợp chất phenolic. Tuy nhiên, trong nghiên cứu trên *S. officinalis* L. [106], các mẫu MWD lại cho cho giá trị FRAP thấp nhất. Tương tự, nghiên cứu sấy bạc hà bằng FRD [184] ghi nhận FRAP cao nhất, tiếp theo là HAD, MWD và cuối cùng là sấy truyền thống. Ngược lại, ở *P. amarus* [176], tia tử ngoại và vi sóng làm giảm tăng khả năng khử, khiến mẫu SD và MWD có giá trị thấp nhất.

Nhìn chung, khi nhiệt độ hoặc công suất sấy tăng, hoạt tính chống oxy hóa (DRSC, ARSC và FRAP) có xu hướng cải thiện, với điều kiện thời gian xử lý đủ ngắn để hạn chế oxy hóa kéo dài. Xu hướng này chủ yếu liên quan đến khả năng phá vỡ cấu trúc mô và giải phóng các hợp chất polyphenol liên kết dưới tác động của năng lượng nhiệt hoặc vi sóng, từ đó làm tăng lượng chất chống oxy hóa sẵn sàng tham gia phản ứng. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước. Ví dụ, trong nghiên cứu sấy lá và thân *H. hirsuta* L. [196, 197] hoạt tính chống oxy hóa tăng rõ rệt khi nhiệt độ sấy không khí nóng tăng từ 80 °C lên 90 °C. Tương tự, trên *S. spinescens* [164], hoạt tính cũng tăng khi nhiệt độ tăng từ 30 °C lên 90 °C. Tuy nhiên, xu hướng này không hoàn toàn đồng nhất. Ở *P. amarus* [176], mẫu IRD30 lại cho DRSC cao nhất, trong khi sấy HAD làm giảm đáng kể hoạt tính. Điều này cho thấy ảnh hưởng của phương pháp sấy phụ thuộc

mạnh vào đặc điểm mô học và trạng thái liên kết của polyphenol trong từng loại dược liệu.

Tóm lại, các kết quả cho thấy điều kiện sấy có ảnh hưởng rõ rệt đến tính chất hóa lý, hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa của rễ ĐS. Trong đó, FRD cho giá trị ARSC, DRSC và FRAP cao nhất, phản ánh khả năng bảo toàn và/hoặc giải phóng các hợp chất phenolic tốt hơn so với các phương pháp còn lại. Tuy nhiên, do yêu cầu thiết bị phức tạp, chi phí vận hành cao và thời gian xử lý kéo dài, phương pháp này còn hạn chế về khả năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp.

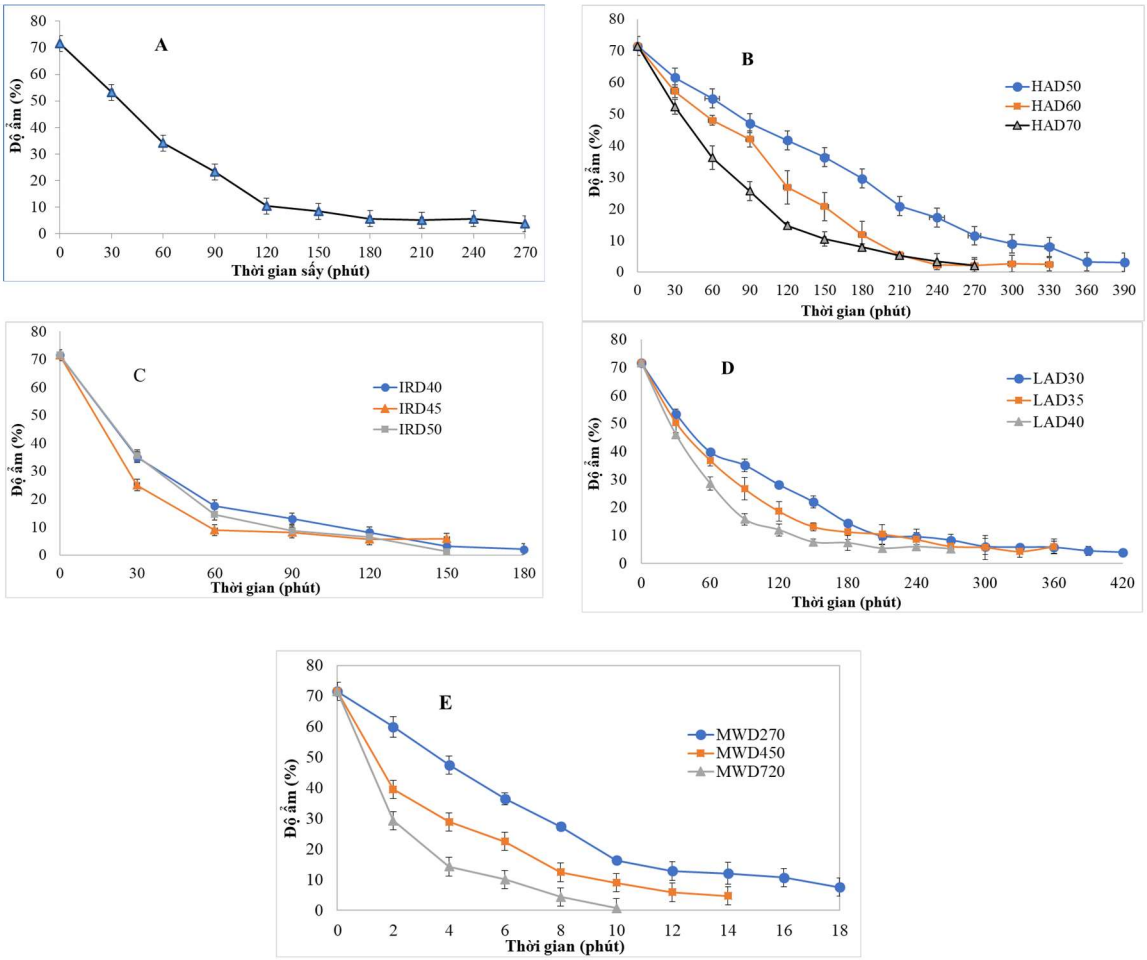
Ngược lại, MWD720 cho hoạt tính chống oxy hóa chỉ thấp hơn FRD nhưng có ưu thế rõ rệt về thời gian xử lý, tiêu thụ năng lượng và khả năng triển khai công nghệ. Nhờ cơ chế gia nhiệt nhanh và rút ngắn thời gian tiếp xúc với oxy, phương pháp này vẫn đảm bảo duy trì hoạt tính ở mức cao. Vì vậy, MWD720 được xem là lựa chọn tiềm năng hơn cho ứng dụng thực tế và định hướng phát triển sản phẩm ĐS sấy khô.

3.1.2. Nghiên cứu điều kiện sấy thân rễ BLMH

3.1.2.1. Đường cong sấy thân rễ BLMH bằng phương pháp và điều kiện sấy khác nhau

Hình 3.4 thể hiện đường cong sấy thân rễ Bảy lá một hoa (BLMH) dưới các điều kiện sấy khác nhau. Xét theo thứ tự, thời gian sấy tăng dần từ MWD, IRD, SD, HAD và LAD. Xu hướng này tương tự như đã quan sát ở rễ ĐS, phản ánh sự chi phối của cơ chế truyền nhiệt và khuếch tán ẩm đặc trưng của từng phương pháp.

Ngoài ra, so với rễ ĐS, thời gian sấy của thân rễ BLMH ngắn hơn đáng kể. Điều này chủ yếu do hàm lượng ẩm ban đầu của rễ ĐS cao hơn, xuất phát từ cấu trúc mô mềm và giàu dịch bào, làm tăng lượng nước cần loại bỏ. Bên cạnh đó, thân rễ BLMH được cắt lát hoặc cắt sợi với kích thước đồng đều, làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc và giảm chiều dày lớp khuếch tán, từ đó rút ngắn quãng đường di chuyển của ẩm và tăng tốc độ truyền khối. Ngược lại, rễ ĐS có cấu trúc dạng bó sợi không đồng nhất, phân bố ẩm phức tạp và đường khuếch tán dài hơn, làm hạn chế tốc độ thoát ẩm ra bề mặt vật liệu.



Hình 3. 4. Đường cong sấy thân rễ BLMH bằng các điều kiện sấy khác nhau

A: Phơi, B: Sấy không khí nóng, C: Sấy hồng ngoại, D: Sấy lạnh, E: Sấy vi sóng

3.1.2.2. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của thân rễ BLMH

a. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến màu sắc của thân rễ BLMH

Kết quả ở Bảng 3.6 cho thấy các phương pháp sấy khác nhau đã gây ra những biến đổi rõ rệt về màu sắc của thân rễ BLMH. Những khác biệt này chủ yếu liên quan đến cơ chế truyền nhiệt, tốc độ tách ẩm và mức độ tiếp xúc của nguyên liệu với nhiệt và oxy trong quá trình sấy.

Về độ sáng (L*), nhìn chung các mẫu sau sấy vẫn duy trì giá trị tương đối cao, cho thấy màu của thân rễ BLMH không bị sẫm đi quá mạnh như ở một số nguyên liệu giàu đường khử hoặc sắc tố rất nhạy nhiệt. Đáng chú ý, các mẫu MWD có giá trị L* (62,20–66,24) gần với mẫu tươi (66,62). Kết quả này phù hợp với cơ chế gia nhiệt điện môi của vi sóng, trong đó năng lượng được hấp thụ trực tiếp bởi các phân tử nước trong vật liệu,

tạo gia nhiệt thể tích và rút ngắn đáng kể thời gian sấy. Nhờ thời gian tiếp xúc với nhiệt và oxy ngắn hơn, các phản ứng oxy hóa và nâu hóa phi enzyme bị hạn chế, nên độ sáng của mẫu được duy trì tốt hơn. Tuy nhiên, ở công suất cao như MWD720, giá trị L* có xu hướng giảm nhẹ, có thể do sự gia nhiệt quá nhanh làm xuất hiện các vùng quá nhiệt cục bộ, từ đó thúc đẩy cục bộ các phản ứng tạo màu và làm mẫu sẫm hơn so với các mức công suất thấp hơn.

Bảng 3. 6. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến màu sắc của thân rễ cây BLMH

Điều kiện sấy	L*	a*	b*	ΔE
SD	72,85 ± 1,71^{d}	2,00 ± 0,44^{de}	18,34 ± 0,89^{de}	51,21 ± 1,77^{e}
HAD50	73,66 ± 2,09^{d}	1,97 ± 0,7^{de}	19,66 ± 2,13^{cd}	51,98 ± 2,15^{e}
HAD60	**76,40 ± 2,10^{abc}**	1,52 ± 0,39^{efg}	19,71 ± 0,24^{cd}	**54,69 ± 2,12^{abcd}**
HAD70	72,51 ± 1,49^{d}	2,33 ± 0,48^{d}	19,34 ± 0,3^{d}	50,81 ± 1,50^{e}
IRD40	74,83 ± 0,75^{bcd}	1,76 ± 0,17^{def}	18,29 ± 0,3^{de}	53,19 ± 0,77^{cde}
IRD45	77,17 ± 2,18^{abc}	1,23 ± 0,38^{efgh}	17,56 ± 0,41^{de}	**55,58 ± 2,15^{abc}**
IRD50	75,87 ± 0,60^{abcd}	1,14 ± 0,12^{fgh}	17,56 ± 0,41^{de}	54,29 ± 0,60^{bcd}
MWD270	64,99 ± 2,18^{ef}	3,09 ± 0,53^{c}	22,70 ± 1,29^{b}	42,28 ± 1,12^{g}
MWD450	66,24 ± 1,60^{e}	3,87 ± 0,80^{b}	23,14 ± 2,26^{b}	44,58 ± 1,51^{f}
MWD720	62,20 ± 1,04^{f}	**6,98 ± 0,35^{a}**	**28,02 ± 0,01^{a}**	41,27 ± 0,98^{g}
LAD30	**77,46 ± 2,43^{ab}**	1,44 ± 0,26^{efgh}	18,65 ± 0,53^{de}	**55,80 ± 2,44^{abc}**
LAD35	**78,30 ± 1,40^{ab}**	1,1 ± 0,22^{fgh}	16,77 ± 0,55^{e}	**56,77 ± 1,45^{ab}**
LAD40	79,23 ± 1,3^{a}	0,74 ± 0,37^{gh}	17,72 ± 0,72^{de}	57,64 ± 1,35^{a}
FRD	**77,41 ± 1,02^{ab}**	0,64 ± 0,23^{h}	19,00 ± 1,73^{de}	**55,75 ± 1,73^{abc}**
FS	66,62 ± 4,00^{e}	2,44 ± 0,45^{d}	21,61 ± 2,39^{bc}	0,00 ± 0,00^{i}

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đối với thông số a*, các mẫu MWD có xu hướng tăng rõ rệt so với mẫu tươi, phản ánh sự chuyển dịch màu theo hướng đỏ hơn. Sự thay đổi này có thể do việc mất nước nhanh làm tăng cường độ màu biểu kiến trên đơn vị khối lượng chất khô. Ngoài ra, trong điều kiện gia nhiệt nhanh, phản ứng nâu hóa phi enzyme có thể xảy ra ở mức độ nhất định, góp phần làm màu chuyển sang tông đỏ–nâu rõ hơn. So với các phương pháp đối lưu, sự thay đổi này ở MWD diễn ra trong thời gian ngắn hơn nhưng với cường độ gia nhiệt cao hơn, nên biểu hiện màu có thể đậm hơn.

Đối với sắc vàng (b*), giá trị b* thay đổi đáng kể giữa các phương pháp. Hai mẫu MWD270 và MWD450 có giá trị b* gần với mẫu tươi hơn, cho thấy ở mức công suất trung bình, vi sóng tạo được sự cân bằng tương đối giữa tốc độ tách ẩm nhanh và mức độ tác động nhiệt vừa phải. Trong khi đó, ở các điều kiện sấy kéo dài hơn, đặc biệt là các phương pháp truyền nhiệt từ ngoài vào trong như HAD hoặc gia nhiệt bề mặt như IRD, thời gian tiếp xúc với oxy lâu hơn có thể làm gia tăng sự biến đổi hoặc suy giảm các sắc tố vàng.

Về tổng độ lệch màu (ΔE), mẫu FRD có giá trị thấp nhất (11,25), cho thấy khả năng duy trì màu sắc gần với nguyên liệu tươi nhất. Kết quả này phản ánh điều kiện sấy nhiệt độ thấp và môi trường chân không giúp hạn chế các phản ứng oxy hóa và nâu hóa. Ngược lại, các phương pháp sấy nhiệt như HAD và IRD cho giá trị ΔE rất cao do đều làm nguyên liệu chịu tác động của nhiệt và oxy trong thời gian tương đối dài, từ đó thúc đẩy mạnh các phản ứng oxy hóa và nâu hóa, dẫn đến sự sai khác màu lớn so với mẫu tươi [51]. Nhóm mẫu MWD có ΔE thấp hơn HAD và IRD nhưng vẫn cao hơn FRD, cho thấy mặc dù vi sóng giúp rút ngắn thời gian sấy và hạn chế bớt biến đổi màu, nhưng khả năng xuất hiện quá nhiệt cục bộ vẫn có thể làm thay đổi đáng kể trạng thái màu của nguyên liệu.

Tóm lại, sự biến đổi màu sắc phụ thuộc chủ yếu vào cơ chế truyền nhiệt, thời gian xử lý và mức độ tiếp xúc với oxy trong quá trình sấy. FRD giúp duy trì màu sắc tốt nhất nhờ điều kiện nhiệt độ thấp và môi trường chân không, hạn chế các phản ứng oxy hóa và nâu hóa. Ngược lại, các phương pháp như HAD và IRD với thời gian xử lý kéo dài trong điều kiện có oxy làm gia tăng phản ứng Maillard và oxy hóa, dẫn đến biến đổi màu rõ rệt so với nguyên liệu ban đầu.

b. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của thân rễ BLMH

- Thời gian sấy: Thời gian sấy tăng dần theo thứ tự MWD, IRD, SD, HAD, LAD và FRD, phản ánh sự khác biệt về cơ chế truyền nhiệt của các phương pháp sấy đã trình bày ở phần rễ ĐS. Trong đó, MWD cho thời gian ngắn nhất do gia nhiệt nhanh trong toàn bộ khối vật liệu, trong khi các phương pháp truyền nhiệt từ ngoài vào trong (SD, HAD, LAD) có tốc độ tách ẩm chậm hơn. FRD có thời gian dài nhất do quá trình thăng hoa diễn ra chậm trong điều kiện áp suất thấp. Kết quả thu được tương đồng với các

nghiên cứu trước đây đối với *P. amarus* [176] và lá *H. hirsuta* L. [197], hoặc sấy đông khô hoa nghệ tây (47 giờ ở -55 °C) [51].

- Tiêu thụ năng lượng: Tiêu thụ năng lượng phụ thuộc chủ yếu vào thời gian sấy và hiệu quả truyền nhiệt. SD không tiêu thụ năng lượng nhưng tiềm ẩn nguy cơ biến đổi chất lượng về vi sinh vật và hoạt chất, hoạt tính. MWD tiêu thụ năng lượng ít nhất (0,12-0,21 kWh), sau đó là IRD (4,5-6,3 kWh), HAD (6,3-9,1 kWh), LAD (9,5-13,3 kWh). FRD tiêu thụ năng lượng cao nhất (105,6 kWh), do thời gian xử lý dài và yêu cầu năng lượng cho quá trình đông lạnh và duy trì chân không.

- Độ ẩm: Độ ẩm của mẫu sấy từ 4,62-10,04%, phản ánh hiệu quả truyền nhiệt – truyền khối của từng phương pháp. Các điều kiện năng lượng cao hoặc có cơ chế tách ẩm hiệu quả như MWD công suất cao và FRD thường cho độ ẩm thấp hơn. Ngược lại, các phương pháp đối lưu hoặc nhiệt thấp kéo dài làm quá trình thoát ẩm chậm hơn, nên độ ẩm cuối thường cao hơn

- Hoạt độ nước: Hoạt độ nước của mẫu tươi cao nhất (0,93), thuận lợi cho vi sinh vật và enzyme hoạt động [81]. Nhìn chung, các điều kiện sấy đều làm giảm hoạt độ nước của mẫu tươi xuống giá trị an toàn (0,32 đến 0,58). Mẫu sấy FRD, MWD720 có hoạt độ nước thấp nhất (0,32 và 0,34), vì đây là hai phương pháp có hiệu quả loại ẩm mạnh nhất: FRD loại nước tương đối triệt để bằng thăng hoa, còn MWD720 tạo gia nhiệt mạnh làm nước thoát ra nhanh. Ngược lại, SD có hoạt độ nước cao nhất (0,58) do cường độ truyền nhiệt thấp và không ổn định, nên lượng nước tự do còn lại lớn hơn.

- Năng suất sấy (DY): DY phụ thuộc nhiều vào mức độ loại nước và tổn thất chất khô trong quá trình sấy. SD cho DY thấp nhất (27,69 g mẫu khô/100g mẫu tươi), có thể do ngoài sự mất nước kéo dài còn có thể xảy ra hao hụt vật chất do oxy hóa, phân hủy hoặc biến đổi bề mặt trong suốt quá trình phơi. Ngược lại, LAD30 và MWD450 có DY cao nhất (42,62 và 41,53 g mẫu khô/100g mẫu tươi), cho thấy hai điều kiện này đạt được sự cân bằng tốt giữa khả năng tách ẩm và hạn chế tổn thất vật chất. Kết quả này tương tự với nghiên cứu sấy *P. amarus* [176], trong đó LAD and MWD cũng thu kết quả DY cao hơn các phương pháp khác.

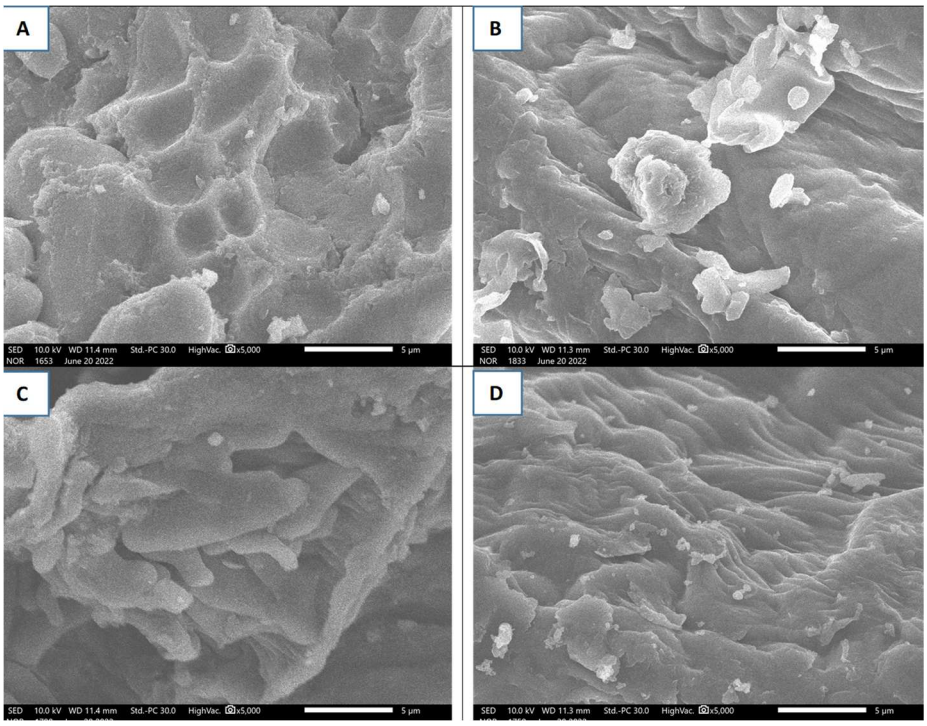
Bảng 3. 7. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến tính chất hóa lý của thân rễ BLMH

Điều kiện sấy	Thời gian sấy (h)	Tiêu thụ năng lượng (kWh)	Độ ẩm (%)	Hoạt độ nước (a_w)	Năng suất sấy (g mẫu khô/ 100g mẫu tươi)	Năng suất chiết (g dịch chiết khô/100g DM)
SD	4,50	0,0	$10,04 \pm 0,22^{b}$	$0,58 \pm 0,01^{b}$	$27,69 \pm 0,61^{h}$	$8,15 \pm 1,28^{cde}$
HAD50	6,50	9,1	$8,17 \pm 0,24^{def}$	$0,47 \pm 0,02^{d}$	$32,74 \pm 1,88^{f}$	$7,87 \pm 1,24^{de}$
HAD60	5,50	7,7	$5,28 \pm 0,55^{cdef}$	$0,45 \pm 0,07^{de}$	$32,75 \pm 1,79^{f}$	$11,39 \pm 1,23^{bcd}$
HAD70	4,50	6,3	$6,49 \pm 1,01^{gh}$	$0,40 \pm 0,02^{fg}$	$32,87 \pm 0,89^{f}$	$12,52 \pm 2,09^{b}$
IRD40	3,50	6,3	$7,99 \pm 0,35^{fg}$	$0,43 \pm 0,01^{def}$	$30,89 \pm 0,20^{g}$	$10,66 \pm 2,13^{bcd}$
IRD45	3,00	5,4	$6,66 \pm 1,06^{efg}$	$0,41 \pm 0,02^{efg}$	$33,61 \pm 0,05^{f}$	$7,81 \pm 1,23^{de}$
IRD50	2,50	4,5	$6,43 \pm 1,31^{hi}$	$0,38 \pm 0,02^{gh}$	$35,47 \pm 1,61^{e}$	$9,83 \pm 1,22^{bcde}$
MWD270	0,73	0,19	$9,90 \pm 0,77^{cd}$	$0,54 \pm 0,01^{c}$	$34,10 \pm 0,73^{ef}$	$6,54 \pm 2,18^{ef}$
MWD450	0,47	0,21	$5,19 \pm 0,65^{fgh}$	$0,45 \pm 0,04^{de}$	$41,03 \pm 0,39^{ab}$	$3,54 \pm 1,23^{f}$
MWD720	0,17	0,12	$4,62 \pm 0,69^{k}$	$0,34 \pm 0,02^{gh}$	$37,86 \pm 0,34^{d}$	$3,41 \pm 1,18^{f}$
LAD30	7,00	13,3	$8,79 \pm 0,86^{bc}$	$0,56 \pm 0,03^{bc}$	$42,62 \pm 0,38^{a}$	$10,31 \pm 1,28^{bcd}$
LAD35	6,00	11,4	$8,92 \pm 0,40^{cde}$	$0,52 \pm 0,03^{bcd}$	$39,02 \pm 0,93^{cd}$	$9,43 \pm 3,32^{bcde}$
LAD40	5,00	9,5	$6,74 \pm 1,23^{cdef}$	$0,47 \pm 0,01^{cde}$	$40,10 \pm 1,38^{bc}$	$11,72 \pm 1,27^{bc}$
FRD	**48,00**	**105,6**	$\mathbf{5,37 \pm 0,50^{ik}}$	$\mathbf{0,32 \pm 0,12^{h}}$	ND	$11,00 \pm 1,19^{bcd}$
FS	ND	ND	$71,54 \pm 0,99^{a}$	$0,93 \pm 0,00^{a}$	ND	$39,82 \pm 4,06^{a}$

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Phương pháp phơi nắng: SD; sấy không khí nóng ở 50 °C, 60 °C, 70 °C: HAD50/60/70; sấy hồng ngoại ở 40 °C, 45 °C, 50 °C: IRD40/45/50; sấy vi sóng ở 270W, 450W, 720W: MWD270/450/720; sấy lạnh ở 30 °C, 35 °C, 40 °C: LAD30/35/40; sấy đông khô: FRD.

- Năng suất chiết (EY): Mẫu tươi cho giá trị EY cao nhất (39,82 g dịch chiết/100 g mẫu khô). Trong các phương pháp sấy, các mẫu HAD70, HAD60, LAD30, LAD35, LAD40, IRD50 và FRD thuộc nhóm có EY cao hơn, cho thấy các điều kiện này tạo được mức độ biến đổi cấu trúc vừa phải hoặc duy trì được hệ mao quản thuận lợi cho dung môi thâm nhập. Đặc biệt, FRD tạo mạng mao quản xốp giúp tăng khả năng tái hydrat hóa. Ngược lại, các mẫu MWD có EY thấp hơn, có thể do gia nhiệt nhanh gây biến tính hoặc co cứng cấu trúc, làm giảm khả năng khuếch tán dung môi [176].

- Cấu trúc bề mặt: Hình 3.5 thể hiện hình thái bề mặt bột thân rễ BLMH sau sấy bằng các phương pháp HAD60, HAD70, SD và FRD, cho thấy sự khác biệt tương đối rõ rệt về cấu trúc mô sau xử lý nhiệt. Trong đó, mẫu FRD có bề mặt nhẵn mịn, ít bị phá hủy và co rút cấu trúc, chứng tỏ quá trình thăng hoa giúp duy trì hình thái tế bào gần như nguyên vẹn [25, 285]. Ngược lại, ở HAD60 và HAD70, tác động nhiệt làm tế bào bị co rút và nứt vỡ, mức độ phá hủy tăng khi nhiệt độ cao hơn (HAD70). Sự truyền nhiệt từ bề mặt vào bên trong khiến chênh lệch áp suất hơi lớn làm thành tế bào bị xẹp nhanh, dẫn đến hình thái bề mặt gồ ghề, có vết nứt và xơ rách vi mô. Đối với SD, nhiệt được cung cấp chậm và không ổn định từ bức xạ mặt trời (đặc biệt là tia UV) kết hợp đối lưu tự nhiên, nên quá trình thoát ẩm kéo dài làm mô thực vật co nén dần, bề mặt trở nên thô ráp và kém đồng nhất. Do tốc độ thoát ẩm chậm, các bó sợi thực vật bị nén lại, làm cấu trúc không xốp như FRD nhưng cũng không bị phá hủy mạnh như HAD.



Hình 3. 5. Hình ảnh SEM mẫu sấy HAD60 (A), HAD70 (B), SD (C), FRD (D)

Như vậy, sự khác biệt hình thái bề mặt giữa các mẫu là hệ quả trực tiếp của sự khác nhau về cơ chế truyền nhiệt, tốc độ thoát ẩm và mức độ co rút cấu trúc trong quá trình sấy.

c. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến hàm lượng các hoạt chất sinh học của thân rễ BLMH

Bảng 3. 8. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hàm lượng các hoạt chất sinh học của thân rễ BLMH

Điều kiện sấy	TSC (mg EE/g DM)	TPC (mg GAE/g DM)	TAC (mg AE/g DM)
SD	$25,52 \pm 0,55^{cd}$	$0,58 \pm 0,06^{de}$	$0,12 \pm 0,03^{fgh}$
HAD50	$17,83 \pm 2,02^{f}$	$0,54 \pm 0,12^{e}$	$0,13 \pm 0,02^{fg}$
HAD60	$\mathbf{27,11 \pm 0,89^{c}}$	$\mathbf{0,78 \pm 0,07^{bc}}$	$0,21 \pm 0,03^{e}$
HAD70	$20,60 \pm 1,75^{ef}$	$0,59 \pm 0,03^{de}$	$0,34 \pm 0,03^{b}$
IRD40	$13,83 \pm 1,66^{g}$	$0,40 \pm 0,02^{f}$	$0,08 \pm 0,01^{hi}$
IRD45	$23,27 \pm 2,58^{de}$	$0,65 \pm 0,04^{de}$	$0,11 \pm 0,01^{ghi}$
IRD50	$27,67 \pm 1,41^{c}$	$0,69 \pm 0,11^{cd}$	$0,21 \pm 0,02^{e}$
MWD270	$24,77 \pm 0,96^{cd}$	$0,44 \pm 0,04^{f}$	$0,14 \pm 0,01^{fg}$
MWD450	$19,26 \pm 2,00^{f}$	$0,62 \pm 0,01^{de}$	$0,30 \pm 0,03^{c}$
MWD720	$14,61 \pm 2,21^{g}$	$0,45 \pm 0,04^{f}$	$0,12 \pm 0,01^{fgh}$
LAD30	$14,67 \pm 1,91^{g}$	$0,39 \pm 0,06^{f}$	$0,15 \pm 0,01^{f}$
LAD35	$19,29 \pm 1,34^{f}$	$0,65 \pm 0,02^{de}$	$0,10 \pm 0,02^{ghi}$
LAD40	$13,35 \pm 0,76^{g}$	$0,39 \pm 0,08^{f}$	$0,07 \pm 0,01^{i}$
FRD	$\mathbf{42,29 \pm 2,72^{b}}$	$\mathbf{0,88 \pm 0,04^{b}}$	$\mathbf{0,25 \pm 0,01^{d}}$
FS	$60,61 \pm 2,26^{a}$	$1,95 \pm 0,10^{a}$	$0,38 \pm 0,05^{a}$

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả ở Bảng 3.8 cho thấy TSC giữa các mẫu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Mẫu tươi có TSC cao nhất (60,61 mg EE/g DM), tiếp theo là mẫu FRD. Các phương pháp SD, IRD50 và HAD60 cho TSC tương đương nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Mặc dù ba phương pháp này khác nhau về cơ chế truyền nhiệt, điểm chung là mức gia nhiệt vừa phải, không gây phá hủy mạnh cấu trúc tế bào nên lượng saponin bị mất không quá lớn. Ngược lại, các mẫu MWD và LAD có TSC thấp nhất. Xu hướng này phù hợp với cơ chế đã trình bày ở ĐS: sấy vi sóng với gia nhiệt nhanh có thể gây quá nhiệt cục bộ và làm suy giảm hoạt chất, trong khi sấy lạnh kéo dài làm tăng oxy hóa dưới điều kiện hiếu khí.

Ngoài ra, nhiệt độ sấy cũng là yếu tố quyết định: trong nhóm HAD, HAD60 có TSC cao hơn HAD50 và HAD70. Nguyên nhân là 60 °C là mức nhiệt không quá cao để gây phân hủy hoạt chất, nhưng cũng đủ để rút ngắn thời gian sấy, hạn chế oxy hóa kéo dài. Đối với IRD, TSC có xu hướng tăng khi tăng nhiệt độ vì hồng ngoại truyền nhiệt theo cơ chế bức xạ trực tiếp, làm giảm thời gian sấy nhiều hơn so với HAD, nhờ đó hạn chế tổn thất saponin dù ở nhiệt độ bề mặt cao hơn.

Các kết quả này cũng có sự tương đồng và khác biệt nhất định với một số nghiên cứu trước đây trên các dược liệu giàu saponin. Cụ thể, tác giả Nguyen [164] khi nghiên cứu trên *S. spinescens* cho thấy FRD không phải là phương pháp giữ TSC cao nhất; ngược lại, HAD ở nhiệt độ cao lại cho TSC lớn hơn. Tương tự, đối với *P. amarus* [176], TSC của mẫu HAD ở 120 °C cao hơn so với 80 °C và 100 °C, trong khi IRD30 lại là mẫu có TSC cao nhất do thời gian sấy ngắn đáng kể. Kết quả sấy lá *H. hirsuta* L. [197] cũng ghi nhận TSC cao nhất ở chế độ HAD90, chứng tỏ khi nhiệt độ đủ cao, sự phá vỡ cấu trúc tế bào mạnh hơn có thể làm tăng khả năng giải phóng hoạt chất trong quá trình trích ly. Mặt khác, nghiên cứu sấy *S. spinescens* của Nguyen [164] cũng cho thấy MWD không hiệu quả trong thu hồi saponins.

Đối với TPC, mẫu FRD và HAD60 có giá trị cao nhất (0,88 và 0,78 mg GAE/g DM), phản ánh vai trò của việc bảo toàn cấu trúc tế bào (FRD) và vô hoạt enzyme polyphenol oxidase ở mức nhiệt tối ưu (HAD60). Ngược lại, các mẫu LAD40, LAD30, IRD40, MWD270 và MWD720 có TPC thấp (0,39–0,44 mg GAE/g DM) và không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Xu hướng này tương đồng với các nghiên cứu trước, trong đó TPC tăng khi nhiệt độ sấy tăng ở *S. spinescens* [164]; và với *H. hirsuta L.*, TPC cao nhất khi sấy không khí nóng ở 80 °C và sấy chân không ở 50 °C [197]. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu không hoàn toàn thống nhất. Sấy lạnh cho TPC cao nhất ở bạc hà [184], hoặc sấy chân không thịt quả cà phê Robusta cho TPC cao hơn HAD [245]. Trong khi ở các nghiên cứu khác, sấy vi sóng công suất cao (vỏ cà rốt, 1200 W) [169], hoặc công suất thấp (*S. spinescens,* 240 W) [164] có TPC cao nhất. Ngoài ra, *P. amarus* đạt TPC cao nhất ở IRD30 [176], trong khi *P. trimera* không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa các điều kiện sấy [171].

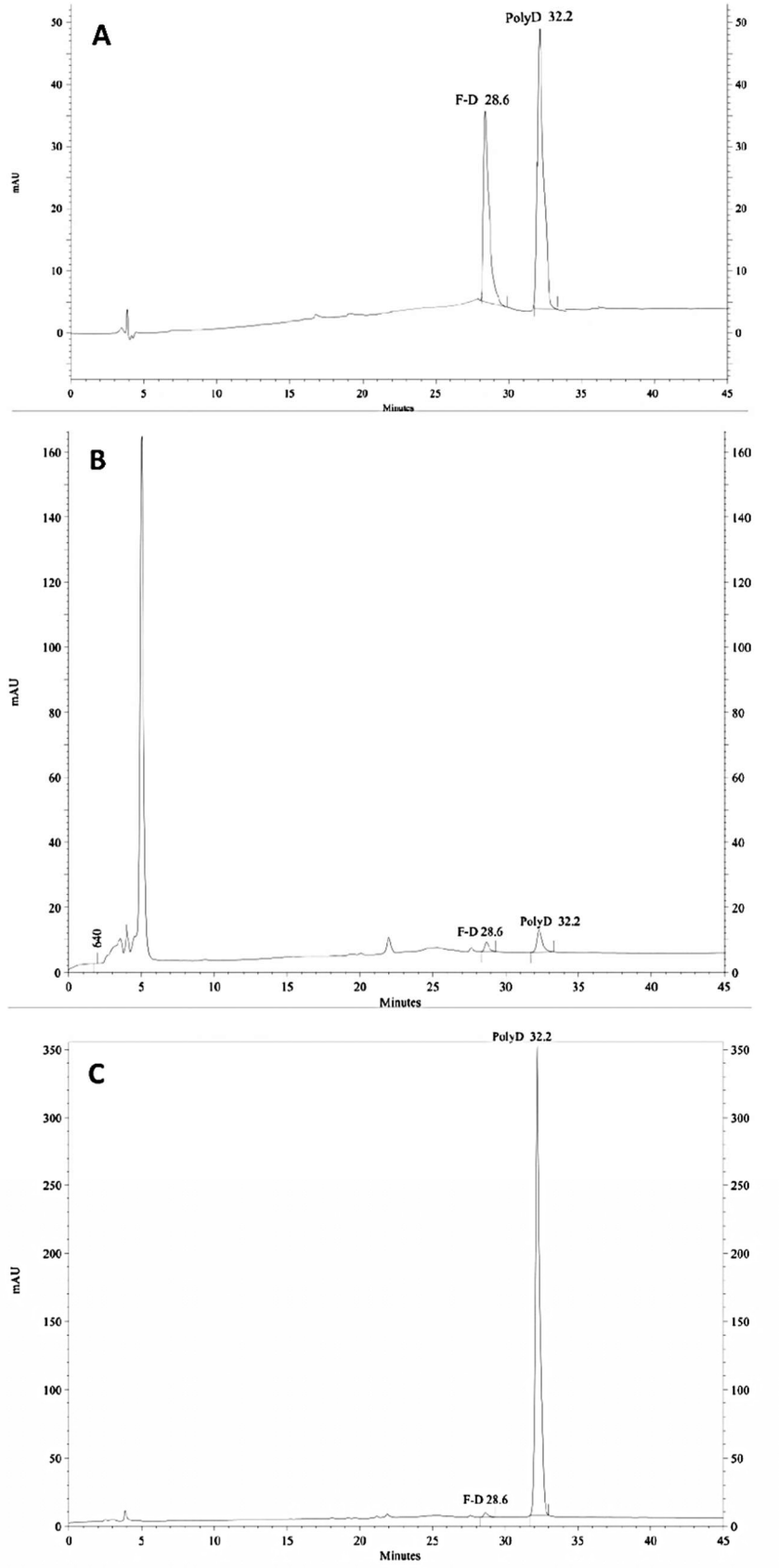
Sự không thống nhất này có thể lý giải bằng các yếu tố sinh hóa và cơ học. Enzyme polyphenol oxidase xúc tác phản ứng oxy hóa polyphenol và hoạt động tối ưu trong khoảng 10-50 °C [127, 294]. Khi nhiệt độ sấy hơn 50 °C, enzyme này bị bất hoạt [128],

giúp giảm phân hủy polyphenol. Tuy nhiên, ở mức cao hơn (như 70 °C), các hợp chất này có thể bị phân hủy nhiệt, làm giảm TPC. Do đó, mức nhiệt trung bình (khoảng 60 °C) có thể xem là là phù hợp để cân bằng giữa bất hoạt enzyme và bảo toàn hợp chất. Ngoài ra, các tác nhân bức xạ trong IRD, MWD và SD (tia hồng ngoại, vi sóng, cực tím) có thể phá vỡ cấu trúc polyphenol thông qua oxy hóa quang hoặc nhiệt cục bộ, gây suy giảm TPC [142]. Thời gian sấy kéo dài trong LAD cũng làm tăng tiếp xúc với oxy, thúc đẩy phản ứng oxy hóa phenolic và làm giảm mạnh TPC [264].

TAC của thân rễ BLMH sau sấy khác biệt đáng kể giữa các phương pháp. Mẫu HAD70 cho giá trị TAC cao nhất, tiếp theo là MWD450 và FRD, song vẫn thấp hơn mẫu tươi (0,38 mg AE/g DM). Mẫu LAD40 có TAC thấp nhất (0,077 mg AE/g DM), chứng tỏ quá trình sấy kéo dài ở nhiệt độ thấp làm gia tăng oxy hóa và phân hủy alkaloid. Kết quả này tương tự nghiên cứu trên vỏ ca cao [175] trong đó nhiệt độ cao giúp phá vỡ cấu trúc tế bào và giải phóng alkaloid. Tuy nhiên, kết quả không hoàn toàn đồng nhất giữa các nguyên liệu; ví dụ, ở khoai tây dây leo, FRD giữ α-solanine cao hơn sấy chân không [100]. Điều này cho thấy khả năng bảo toàn alkaloid phụ thuộc không chỉ vào điều kiện sấy mà còn vào đặc tính hóa học và cấu trúc mô của nguyên liệu.

Falcarindiol and Polyphyllin D là các hoạt chất sinh học quan trọng đặc trưng trong thân rễ BLMH [115, 134]. Trong nghiên cứu này, mẫu HAD60 được lựa chọn để phân tích do đây là phương pháp sấy bảo toàn hoạt chất tốt và có hiệu suất trích ly cao hơn so với các điều kiện sấy khác. Kết quả định tính và định danh các hợp chất chính bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được thể hiện trong Hình 3.6. Thông qua việc so sánh thời gian lưu giữa mẫu thử và chất chuẩn, có thể khẳng định sự hiện diện của Falcarindiol và Polyphyllin D trong cả mẫu tươi và mẫu sấy khô, với thời gian lưu lần lượt khoảng 28,6 và 32,2 phút. Điều này chứng tỏ rằng quá trình sấy ở 60 °C không gây phân hủy hai hợp chất chủ đạo này, đồng thời xác nhận tính bền nhiệt tương đối của chúng trong điều kiện sấy đối lưu không khí nóng ở mức nhiệt vừa phải.

Bảng 3.9 cho thấy hàm lượng Falcarindiol và Polyphyllin D trong mẫu tươi lần lượt là 17,35 mg/100 g DM và 17,16 mg/100 g DM, trong khi ở mẫu HAD60 các giá trị tương ứng là 5,60 mg/100 g DM và 96,57 mg/100 g DM. Kết quả cho thấy Falcarindiol giảm đáng kể sau sấy, chứng tỏ hợp chất này nhạy cảm hơn với nhiệt.



Hình 3. 6. Sắc ký đồ HPLC của mẫu thân rễ BLMH tươi (B) và HAD60 (C)

Bảng 3. 9. Hàm lượng hoạt chất sinh học trong thân rễ BLMH

Mẫu	Hoạt chất	Hàm lượng (mg/100 g DM)
HAD60	Falcarindiol	5,60 ± 0,42
	Polyphyllin D	96,57 ± 3,22
FS	Falcarindiol	17,35 ± 2,11
	Polyphyllin D	17,16 ± 1,39

Ngược lại, hàm lượng Polyphyllin D xác định trong mẫu HAD60 cao hơn rõ rệt so với mẫu tươi. Hiện tượng này có thể được giải thích dựa trên các nghiên cứu về dược liệu cùng chi *Paris*. Cụ thể, Guan và cộng sự (2021) [87] cho thấy quá trình sấy bằng không khí nóng kích thích sự biến đổi từ các *proto-pennogenyl glycosides* thành *pennogenyl glycosides* (nhóm Polyphyllin), dẫn đến sự gia tăng hàm lượng của một số hoạt chất chính khi định lượng bằng HPLC/UPLC. Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận ở gừng (*Zingiber officinale*), trong đó nhiệt độ sấy có thể thúc đẩy phản ứng khử nước chuyển hóa 6-gingerol thành 6-shogaol, làm tăng hàm lượng chất sau sấy so với mẫu tươi [238]. Bên cạnh đó, quá trình nhiệt gây phá vỡ cấu trúc mô và màng tế bào [25, 123], giúp dung môi dễ dàng thâm nhập và hòa tan hoạt chất hơn so với mô tươi còn nguyên vẹn, từ đó làm tăng khả năng thu nhận Polyphyllin D. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác cơ chế này cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn về thành phần và cấu trúc hóa học.

d. Ảnh hưởng của phương pháp và điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của thân rễ BLMH

Bảng 3.10 cho thấy ARSC giữa các chế độ sấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Mẫu FRD có ARSC cao nhất (2,66 mg TE/g DM), tiếp theo là IRD50, HAD60 và IRD45 (2,28; 2,23 và 2,22 mg TE/g DM), mặc dù vẫn thấp hơn đáng kể so với mẫu tươi (2,94 mg TE/g DM). Ngược lại, các mẫu MWD – dù có thời gian sấy ngắn nhất – lại không thể hiện ARSC cao, và các mẫu LAD và SD có ARSC thấp nhất.

Kết quả này cho thấy ARSC có mối tương quan mạnh TPC [142, 197]. Các mẫu FRD, IRD50 và HAD60 có ARSC cao hơn, phù hợp với việc những điều kiện này giúp bảo toàn TPC tốt hơn nhờ cân bằng giữa nhiệt và thời gian sấy. Xét về cơ chế, ở FRD, quá trình thăng hoa trong điều kiện nhiệt độ thấp và áp suất thấp giúp hạn chế oxy hóa và bảo toàn tốt hơn các hợp chất chống oxy hóa. Trong khi đó, ở HAD60 và IRD50,

mức nhiệt đủ để rút ngắn thời gian sấy và góp phần bất hoạt enzyme oxy hóa, nhưng chưa quá cao để gây phân hủy mạnh hoạt chất. Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận ở *S. spinescens* [164], *P. amarus* [176] và *H. hirsuta* L. [197], khi tăng nhiệt độ sấy không khí nóng trong giới hạn thích hợp làm tăng DRSC, ARSC và FRAP. Sự gia tăng hoạt tính có thể liên quan đến việc enzyme polyphenol oxydase bị bất hoạt ở nhiệt độ trên 50 °C [128]; thời gian sấy ngắn hơn giúp giảm oxy hóa [263], đồng thời sự biến đổi cấu trúc mô hỗ trợ giải phóng polyphenol tự do [92]. Ngoài ra, trong một số điều kiện sấy nhiệt, các sản phẩm trung gian của phản ứng Maillard cũng có thể góp phần làm tăng hoạt tính chống oxy hóa [24, 280].

Bảng 3. 10. Ảnh hưởng của điều kiện sấy đến hoạt tính chống oxy hóa của thân rễ BLMH

Điều kiện sấy	ARSC (mg TE/g DM)	DRSC (mg TE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
SD	$1,53 \pm 0,13^{h}$	$1,19 \pm 0,07^{e}$	$0,58 \pm 0,05^{i}$
HAD50	$1,71 \pm 0,09^{fgh}$	$0,28 \pm 0,07^{h}$	$0,94 \pm 0,05^{ef}$
HAD60	**$2,23 \pm 0,08^{c}$**	**$1,47 \pm 0,01^{c}$**	**$1,27 \pm 0,05^{c}$**
HAD70	$1,89 \pm 0,06^{def}$	$1,31 \pm 0,02^{de}$	$0,67 \pm 0,03^{hi}$
IRD40	$1,76 \pm 0,16^{efg}$	$0,42 \pm 0,03^{g}$	$0,74 \pm 0,08^{gh}$
IRD45	$2,03 \pm 0,19^{d}$	$1,23 \pm 0,05^{de}$	$0,87 \pm 0,15^{fg}$
IRD50	$2,28 \pm 0,19^{c}$	$1,26 \pm 0,08^{de}$	$0,96 \pm 0,16^{ef}$
MWD270	$1,78 \pm 0,03^{efg}$	$0,40 \pm 0,02^{g}$	$0,88 \pm 0,04^{fg}$
MWD450	$1,95 \pm 0,17^{de}$	$1,32 \pm 0,13^{d}$	$1,08 \pm 0,12^{de}$
MWD720	$1,23 \pm 0,04^{i}$	$0,76 \pm 0,05^{f}$	$1,18 \pm 0,09^{cd}$
LAD30	$1,58 \pm 0,08^{gh}$	$0,42 \pm 0,05^{g}$	$0,60 \pm 0,02^{hi}$
LAD35	$1,65 \pm 0,01^{gh}$	$0,49 \pm 0,04^{g}$	$0,61 \pm 0,09^{hi}$
LAD40	$1,65 \pm 0,09^{gh}$	$0,25 \pm 0,02^{h}$	$0,76 \pm 0,04^{gh}$
FRD	**$2,66 \pm 0,11^{b}$**	**$2,01 \pm 0,01^{b}$**	**$1,49 \pm 0,06^{b}$**
FS	$2,94 \pm 0,04^{a}$	$3,61 \pm 0,14^{a}$	$1,72 \pm 0,13^{a}$

Các chữ cái viết tắt khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Ngược lại, MWD, SD và LAD đều có ARSC thấp. Tia vi sóng (trong MWD), tia cực tím (trong SD) và nhiệt độ thấp nhưng thời gian sấy kéo dài (trong LAD) đều có tác động bất lợi lên khả năng khử gốc $ABTS^{\bullet+}$. Kết quả này tương tự với nghiên cứu trên *P. amarus* [176] cho thấy cường độ bức xạ và thời gian xử lý kéo dài có thể ức chế quá

trình chuyển electron đơn từ chất chống oxy hóa đến gốc ABTS, làm giảm hiệu suất bắt giữ gốc tự do. Tuy nhiên, một số nghiên cứu lại ghi nhận xu hướng ngược lại như vỏ cà rốt [169] và vỏ chuối [251], trong đó MWD lại cho giá trị ARSC cao nhất.

Tất cả mẫu sấy đều có DRSC thấp hơn đáng kể so với mẫu tươi, cho thấy quá trình sấy làm suy giảm khả năng bắt giữ gốc DPPH•. Kết quả này vừa phù hợp vừa khác biệt với các nghiên cứu trước: ở *H. hirsuta L.* và *S. spinescens*, việc tăng nhiệt độ sấy (80-90 °C) giúp nâng cao DRSC, ARSC và FRAP nhờ phá vỡ mô tế bào và vô hoạt enzyme oxy hóa [164, 196, 197]; ngược lại ở *P. amarus* [176], mẫu IRD30 cho DRSC cao nhất, trong khi HAD làm giảm đáng kể hoạt tính chống oxy hóa.

Giá trị FRAP giữa các phương pháp sấy khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Mẫu FRD cho FRAP cao nhất (1,49 mg TE/g DM), tiếp theo là HAD60, MWD720 và MWD450 (1,27; 1,18 và 1,08 mg TE/g DM), trong khi SD thấp nhất (0,58 mg TE/g DM). Điều này cho thấy FRD bảo toàn cấu trúc hoạt chất và hạn chế oxy hóa tốt nhất, ngược lại, SD làm suy giảm mạnh các chất khử trong điều kiện sấy kéo dài và tiếp xúc liên tục với oxy và ánh sáng. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước, khi sấy không khí đối lưu cho FRAP cao, còn vi sóng làm giảm mạnh hoạt tính ở *S. officinalis L.* [106]; sấy lạnh cho FRAP cao nhất ở bạc hà [184] và ở *H. hirsuta L.*, sấy HAD 80-90 °C chỉ kém sấy chân không 50 °C [196, 197].

Tuy nhiên, một số nghiên cứu lại cho kết quả trái chiều. Sấy vỏ cà rốt [169] và vỏ chuối [251] cho thấy mẫu MWD ở công suất cao có FRAP cao nhất, tương tự xu hướng ghi nhận ở mẫu thân rễ BLMH MWD720. Điều này cho thấy bức xạ vi sóng không phải lúc nào cũng làm giảm hoạt tính, mà hiệu quả còn phụ thuộc vào đặc tính hoạt chất: với các hợp chất bền nhiệt hoặc gắn sâu trong mô thực vật, gia nhiệt thể tích của MWD có thể phá vỡ cấu trúc và giải phóng hoạt chất, làm tăng FRAP. Ngược lại, nghiên cứu trên *P. amarus* [176] cho thấy bức xạ cực tím và vi sóng lại gây tác động bất lợi rõ rệt, khiến các mẫu SD và MWD có FRAP thấp nhất.

Tóm lại, kết quả cho thấy điều kiện sấy ảnh hưởng rõ rệt đến đặc tính hóa lý, hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa của thân rễ BLMH. Trong đó, sấy không khí nóng ở 60 °C (HAD60) đạt sự cân bằng tối ưu giữa chất lượng và hiệu quả: cấu trúc tế bào được bảo toàn, thoát ẩm hiệu quả, hàm lượng hoạt chất duy trì ở mức cao, và các chỉ số chống oxy hóa (ARSC, DRSC, FRAP) ổn định. Do đó, HAD60 được

xem là điều kiện sấy thích hợp nhất để bảo toàn hợp chất hoạt tính và duy trì khả năng chống oxy hóa của nguyên liệu sau sấy.

3.2. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết

3.2.1. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết rễ ĐS

3.2.1.1. Kết quả lựa chọn loại dung môi và phương pháp chiết rễ ĐS

Bảng 3.11 trình bày kết quả khảo sát riêng biệt ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết rễ ĐS.

Kết quả ở Bảng 3.11 cho thấy dung môi ethanol 50% (E50) cho hiệu quả chiết cao đối với các hợp chất có hoạt tính sinh học, thể hiện qua các giá trị TSC, TPC cao nhất, đồng thời hoạt tính ARSC và DRSC đạt mức cao nhất so với các dung môi khảo sát khác. Điều này cho thấy hệ dung môi ethanol–nước ở nồng độ 50% có khả năng chiết xuất hiệu quả các hợp chất sinh học từ nguyên liệu.

Hiệu quả này có thể được giải thích thông qua độ phân cực và hằng số điện môi của hệ dung môi. Độ phân cực quyết định khả năng hình thành các tương tác liên phân tử như liên kết hydro và tương tác lưỡng cực giữa dung môi với hoạt chất; trong khi hằng số điện môi phản ánh khả năng làm suy yếu lực hút tĩnh điện giữa các phân tử, từ đó hỗ trợ quá trình hòa tan. Trong đó, độ phân cực trung gian của hệ dung môi ethanol–nước (độ phân cực và hằng số điện môi của ethanol tinh khiết là 5,2 và 24,3), cho phép hòa tan đồng thời các hợp chất phân cực (như phenolic, saponin) và bán phân cực. So với các dung môi có độ phân cực và hằng số điện môi cao (như nước, methanol tương ứng là 9,0 và 78,5; 5,1 và 32,6) hoặc thấp hơn (như ethyl acetate, chloroform tương ứng là 4,4 và 6,0; 4,1 và 4,8), hệ dung môi ethanol – nước (50%) cho khả năng hòa tan cân bằng hơn đối với nhiều nhóm hoạt chất, từ đó cho hiệu quả chiết tổng thể cao hơn trong điều kiện khảo sát. Đồng thời, sự có mặt của nước góp phần làm trương nở cấu trúc mô thực vật, làm giảm trở lực khuếch tán và tạo điều kiện thuận lợi cho dung môi thâm nhập vào tế bào. Ngoài ra, chênh lệch áp suất thẩm thấu giữa dung môi và dịch bào cũng góp phần làm suy yếu cấu trúc tế bào, tăng khả năng giải phóng hoạt chất [15, 96]. Như vậy, kết quả khảo sát cho thấy hệ dung môi ethanol–nước cho hiệu quả chiết cao hơn ethanol tuyệt đối, chứng tỏ sự phối hợp giữa ethanol và nước có vai trò quan trọng trong quá trình thu nhận hoạt chất. Ngoài ra, ethanol là dung môi an toàn, chi phí thấp và phù hợp cho cả nghiên cứu lẫn ứng dụng công nghiệp; do đó, hệ dung môi ethanol–nước được lựa chọn cho các nghiên cứu chiết tách tiếp theo.

Bảng 3. 11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết rễ ĐS

Dung môi/ phương pháp chiết		TPC (mg GAE/ g DM)	TFC (mg CE/g DM)	TSC (mg EE/g DM)	ARSC (mg TE/g DM)	DRSC (mg TE/ g DM)	FRAP (mg TE/ g DM)
1/ Dung môi	Nước	22,97±2,71^{b}	**2,70±0,08^{a}**	20,27±1,10^{d}	80,65±0,73^{b}	**65,30±2,81^{a}**	**60,78±3,22^{a}**
	Me100	6,12±0,25^{c}	0,97±0,04^{c}	36,90±3,63^{b}	12,22±0,50^{d}	14,79±0,74^{c}	17,76±0,92^{d}
	Me50	**24,86±1,12^{ab}**	**2,68±0,16^{a}**	18,7±1,63^{de}	**94,43±2,92^{a}**	58,87±3,91^{b}	53,54±2,16^{b}
	E100	2,24±0,12^{d}	0,20±0,01^{d}	19,99±1,22^{d}	2,51±0,08^{e}	0,53±0,19^{d}	3,29±0,40^{e}
	E50	**25,04±1,00^{a}**	**2,47±0,14^{b}**	**40,90±2,28^{a}**	**90,50±6,08^{a}**	**64,39±3,43^{a}**	**54,32±0,43^{b}**
	AC100	1,00±0,06^{d}	0,16±0,01^{d}	15,65±2,43^{e}	1,42±0,14^{e}	1,36±0,29^{d}	1,77±0,12^{e}
	AC50	**23,96±1,16^{ab}**	2,40±0,18^{b}	29,82±1,39^{c}	68,32±9,35^{c}	58,74±4,39^{b}	47,64±4,81^{c}
	EA	1,04±0,24^{d}	0,16±0,01^{d}	17,87±1,28^{de}	1,32±0,08^{e}	0,75±0,21^{d}	2,11±0,19^{e}
	Cl	0,38±0,07^{d}	0,08±0,02^{d}	11,00±1,66^{f}	0,66±0,04^{e}	0,42±0,15^{d}	0,92±0,14^{e}
2/ Phương pháp	CE	26,60±1,37^{b}	2,70±0,14^{b}	43,27±3,77^{b}	**97,08±5,36^{a}**	51,63±3,74^{b}	64,16±2,17^{b}
	UAE	**29,05±0,70^{a}**	**2,95±0,09^{a}**	**51,08±0,86^{a}**	**105,67±3,80^{a}**	**59,27±0,51^{a}**	**67,29±0,50^{a}**
	MAE	**29,91±0,43^{a}**	**3,15±0,12^{a}**	**49,11±0,65^{a}**	**105,73±12,92^{a}**	**58,68±1,01^{a}**	**68,27±1,40^{a}**

Kết quả thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, các chữ cái trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%; TPC – hàm lượng phenolic tổng số; TFC – hàm lượng flavonoid tổng số; TSC – hàm lượng saponin tổng số; ARSC: khả năng quét gốc tự do ABTS; DRSC: khả năng quét gốc tự do DPPH; FRAP: khả năng khử sắt

Phương pháp chiết ảnh hưởng rõ rệt đến hàm lượng hợp chất sinh học và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết. Hai phương pháp UAE và MAE cho hiệu quả thu nhận hoạt chất cao hơn đáng kể so với chiết truyền thống (CE); các giá trị TPC, TFC, TSC, cũng như ARSC, DRSC và FRAP đều vượt trội hơn. Sự cải thiện này có thể được giải thích bởi cơ chế tăng cường truyền khối và phá vỡ cấu trúc tế bào của hai phương pháp. Trong UAE, hiện tượng tạo và sụp vỡ bọt khí trong môi trường lỏng sinh ra áp suất và nhiệt độ cục bộ rất cao, góp phần phá vỡ thành tế bào, tăng diện tích tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu, từ đó thúc đẩy quá trình khuếch tán và giải phóng các hợp chất sinh học vào dịch chiết. Trong khi đó, MAE tạo ra sự gia nhiệt nhanh và đồng đều từ bên trong nguyên liệu thông qua tương tác của vi sóng với các phân tử phân cực (như nước, dung môi), làm tăng áp suất nội bào và thúc đẩy quá trình thoát chất ra môi trường chiết [246]. Mặc dù sự khác biệt giữa UAE và MAE không có ý nghĩa thống kê, UAE được đánh giá ưu thế hơn về mặt thực tiễn nhờ cấu hình thiết bị đơn giản, chi phí thấp và khả năng mở rộng quy mô thuận lợi hơn. Do đó, UAE được lựa chọn làm phương pháp chiết cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.1.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện chiết rễ ĐS

a. Nồng độ ethanol

Sau khảo sát ban đầu, ethanol 50% được xác định là nồng độ có hiệu quả chiết tốt trong điều kiện sàng lọc. Trên cơ sở đó, nghiên cứu tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ethanol trong khoảng rộng hơn (30–90%) nhằm đánh giá xu hướng biến thiên của các chỉ tiêu đáp ứng và làm cơ sở cho bước tối ưu hóa tiếp theo.

Kết quả ở Bảng 3.12 cho thấy trong khoảng khảo sát 30–90%, giá trị TSC tăng từ 30% đến 70% ethanol và giảm khi tăng lên 90%, trong khi TPC và FRAP có xu hướng giảm ở vùng ethanol cao. Điều này cho thấy vùng nồng độ trung bình là vùng có triển vọng hơn so với hai đầu khoảng khảo sát.

Xu hướng này có thể được giải thích bởi sự thay đổi độ phân cực của hệ dung môi ethanol–nước. Ở nồng độ ethanol trung bình (60–70%), hệ dung môi có độ phân cực phù hợp để hòa tan đồng thời các hợp chất phân cực và bán phân cực, đồng thời vẫn duy trì khả năng làm trương nở cấu trúc mô nhờ sự hiện diện của nước. Khi nồng độ ethanol tăng cao (80–90%), độ phân cực của dung môi giảm, làm hạn chế khả năng hòa tan các hợp chất phân cực. Đồng thời, hàm lượng nước giảm cũng làm giảm mức độ trương nở của mô thực vật, từ đó làm giảm hiệu quả khuếch tán và giải phóng hoạt chất.

Do đó, khoảng nồng độ ethanol 60–80% được lựa chọn cho các thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố tiếp theo nhằm bao quanh vùng có giá trị đáp ứng cao, đồng thời đảm bảo đủ độ biến thiên để xây dựng mô hình RSM.

Bảng 3. 12. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng chiết rễ ĐS

Các yếu tố ảnh hưởng	Thông số	TSC (mg EE/g DM)	TPC (mg GAE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
Nồng độ ethanol (%)	30 (E30)	43,70 ± 0,96^{b}	15,81 ± 0,54^{a}	44,13 ± 0,72^{a}
	50 (E50)	49,35 ± 7,67^{b}	15,47 ± 0,06^{a}	45,30 ± 0,85^{a}
	70 (E70)	**60,34± 3,81^{a}**	**15,87 ± 0,46^{a}**	**40,28 ± 1,72^{b}**
	90 (E90)	47,36 ± 1,63^{b}	12,40 ± 1,89^{b}	30,17 ± 2,12^{c}
Nhiệt độ (°C)	30	48,32 ± 7,02^{b}	27,81 ± 0,91^{ab}	44,26 ± 1,59^{a}
	40	53,63 ± 3,36^{ab}	26,95 ± 0,98^{b}	37,16 ± 2,07^{b}
	50	**61,02 ± 2,82^{a}**	**27,63 ± 0,86^{ab}**	**38,99 ± 5,28^{ab}**
	60	52,14 ± 2,38^{b}	28,09 ± 1,82^{ab}	39,57 ± 1,08^{ab}
	70	52,48 ± 2,47^{b}	28,55 ± 0,51^{ab}	38,97± 4,88^{ab}
	80	50,13 ± 5,85^{b}	29,23 ± 1,35^{a}	37,74 ± 1,47^{b}
Thời gian (phút)	10	44,12 ± 1,86^{b}	23,39 ± 1,62^{b}	40,42 ± 1,63^{a}
	20	**54,84 ± 3,55^{a}**	**24,83 ± 1,96^{b}**	**41,16 ± 1,85^{a}**
	30	44,90 ± 2,71^{b}	25,61 ± 0,27^{b}	43,69 ± 2,98^{a}
	40	42,62 ± 5,86^{b}	28,36 ± 0,57^{a}	43,20 ± 2,49^{a}
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)	1/20	35,87 ± 1,02^{c}	14,43 ± 0,34^{e}	29,90 ± 0,76^{c}
	1/40	49,27 ± 1,52^{b}	23,59 ± 0,70^{d}	38,85 ± 5,51^{b}
	1/60	51,09 ± 4,54^{b}	27,29 ± 0,96^{c}	36,79 ± 2,18^{b}
	1/80	**59,88 ± 2,02^{a}**	**31,58 ± 1,23^{b}**	**51,92 ± 1,98^{a}**
	1/100	54,00 ± 2,78^{b}	35,89 ± 1,13^{a}	53,93 ± 2,16^{a}

Kết quả thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%. ($p<0,05$); TPC – hàm lượng phenolic tổng số; tổng số; TSC – hàm lượng saponin; FRAP: khả năng khử sắt.

b. Nhiệt độ

Kết quả cho thấy TPC không thay đổi đáng kể theo nhiệt độ, trong khi TSC đạt giá trị cao nhất tại 50 °C và giảm ở các mức nhiệt cao hơn. Giá trị FRAP tương đối ổn định trong khoảng 40–60 °C nhưng có xu hướng giảm khi nhiệt độ tăng lên 80 °C.

Xu hướng này phản ánh sự cân bằng giữa hai yếu tố: tăng nhiệt độ giúp giảm độ nhớt dung môi, tăng hệ số khuếch tán và tốc độ truyền khối, từ đó nâng cao hiệu quả

chiết. Tuy nhiên, ở nhiệt độ cao, một số hợp chất sinh học có thể bị oxy hóa, phân hủy hoặc biến đổi, dẫn đến giảm hoạt tính sinh học [206].

Ngoài ra, trong điều kiện UAE, nhiệt độ cao làm giảm sức căng bề mặt và áp suất hơi của dung môi, từ đó ảnh hưởng đến quá trình hình thành và sụp vỡ bọt khí. Vì vậy, vùng nhiệt độ trung bình thường được xem là phù hợp để đảm bảo hiệu quả chiết và hạn chế suy giảm hoạt chất.

Do đó, khoảng nhiệt độ 40–60 °C được lựa chọn cho bước tối ưu hóa nhằm bao quanh vùng có hiệu quả chiết thuận lợi và đảm bảo điều kiện xây dựng mô hình.

c. Thời gian

Đối với yếu tố thời gian, TPC không khác biệt đáng kể trong khoảng 10–30 phút nhưng có xu hướng tăng khi kéo dài đến 40 phút. Ngược lại, TSC đạt giá trị cao nhất tại 20 phút và giảm khi thời gian chiết tăng lên, trong khi FRAP không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mức khảo sát.

Kết quả này cho thấy quá trình chiết diễn ra nhanh trong giai đoạn đầu do chênh lệch nồng độ lớn giữa dung môi và nguyên liệu, sau đó đạt trạng thái gần cân bằng. Việc kéo dài thời gian không mang lại cải thiện rõ rệt, thậm chí có thể làm giảm hiệu quả thu nhận do hiện tượng phân hủy hoặc oxy hóa các hợp chất nhạy cảm.

Ngoài ra, trong UAE, thời gian chiết cần được kiểm soát do quá trình hình thành và phá vỡ bọt khí kéo dài có thể làm gia tăng quá trình oxy hóa và biến đổi cấu trúc của một số hợp chất sinh học.

Do đó, khoảng thời gian 10–30 phút được lựa chọn nhằm bao quanh vùng có hiệu quả chiết tốt và đảm bảo tính phù hợp cho bước tối ưu hóa.

d. Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng thu nhận các hợp chất sinh học. TSC đạt giá trị cao nhất tại tỷ lệ 1/80 (g/mL) và giảm khi tiếp tục tăng lượng dung môi, trong khi TPC tăng dần và đạt giá trị cao nhất tại 1/100 (g/mL). Giá trị FRAP cũng có xu hướng tăng và ổn định ở các mức tỷ lệ cao (≥1/80).

Xu hướng này có thể được giải thích bởi ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến gradient nồng độ và khả năng truyền khối. Khi tăng lượng dung môi, chênh lệch nồng độ giữa dung môi và nguyên liệu tăng, thúc đẩy quá trình khuếch tán và hòa tan hoạt chất vào

dung môi. Tuy nhiên, khi lượng dung môi quá lớn, hiệu quả chiết không tiếp tục cải thiện đáng kể do hệ đạt trạng thái cân bằng.

Đối với UAE, tỷ lệ dung môi còn ảnh hưởng đến khả năng lan truyền sóng siêu âm trong môi trường và mức độ hình thành bọt khí, từ đó tác động đến hiệu quả xâm thực và quá trình giải phóng hoạt chất.

Do đó, khoảng tỷ lệ 1/60–1/100 (g/mL) được lựa chọn nhằm bao quanh vùng có hiệu quả chiết thuận lợi và phục vụ xây dựng mô hình RSM.

Tóm lại, các khoảng biên phù hợp để đưa vào thí nghiệm tối ưu hóa được lựa chọn như sau: sử dụng phương pháp chiết UAE; nồng độ ethanol 60-80%; nhiệt độ chiết 40-60 °C; thời gian chiết 10-30 phút; và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/60-1/100 (g/mL).

3.2.1.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết rễ cây ĐS

a. Đánh giá sự tương thích của mô hình

Số liệu thực nghiệm thu được khi thực hiện tối ưu quá trình chiết rễ ĐS với ma trận bố trí thí nghiệm được trình bày ở Phụ lục 3.1

Bảng 3.13 thể hiện kết quả phân tích phương sai (ANOVA) của kết quả thí nghiệm đối với mô hình bậc 2 và các hệ số của phương trình hồi quy thu được. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy phương trình hồi quy bậc hai phù hợp tốt với dữ liệu thực nghiệm, thể hiện qua hệ số tương quan R^2 cao. Theo Andrich và cộng sự [26], một mô hình được xem là phù hợp với các giá trị thực nghiệm khi $R^2 > 0,75$. Trong nghiên cứu này, các giá trị R^2 của TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP lần lượt là 0,91; 0,91; 0,91; 0,92 và 0,82, chứng tỏ 91%, 91%, 91%, 92% và 82% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán từ mô hình. Bên cạnh đó, theo Zolgharnein [306], sự chênh lệch giữa R^2 dự đoán và R^2 hiệu chỉnh nên nằm trong khoảng 0,20 để mô hình ổn định và có khả năng dự báo tốt. Kết quả cho thấy R^2 dự đoán trong nghiên cứu này phù hợp với R^2 hiệu chỉnh, do đó các mô hình TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP có khả năng dự đoán tốt.

Bảng 3. 13 Các hệ số của phương trình hồi quy và kết quả phân tích phương sai

Hệ số hồi quy	TSC (Y_1)		SEE (Y_2)		TPC (Y_3)		ARSC (Y_4)		FRAP (Y_5)	
	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*
β_0	**50,05**	**<0,0001**	**68,33**	**<0,0001**	**48,03**	**<0,0001**	**93,66**	**<0,0001**	**85,26**	**<0,0001**
β_1	**7,66**	**<0,0001**	**10,47**	**<0,0001**	**-5,06**	**0,0014**	**-9,54**	**0,0010**	-3,53	0,2489
β_2	**-4,47**	**0,0032**	**-6,10**	**0,0032**	-2,22	0,947	**-6,28**	**0,0148**	0,48	0,8719
β_3	**4,82**	**0,0019**	**6,58**	**0,0019**	**6,96**	**0,0001**	**14,28**	**0,0001**	**9,98**	**0,0051**
β_4	**4,81**	**0,0020**	**6,56**	**0,0019**	**7,26**	**0,0001**	**13,26**	**0,0001**	**12,94**	**0,0008**
β_{12}	0,69	0,7497	0,945	0,7489	1,95	0,3745	2,81	0,4761	-0,92	0,8579
β_{13}	2,03	0,3551	2,77	0,3551	-0,40	0,8518	-1,79	0,6470	-1,61	0,7545
β_{23}	-3,06	0,1723	-4,18	0,1723	0,91	0,6740	2,36	0,5490	-2,74	0,5967
β_{14}	0,83	0,7005	1,14	0,6997	-0,83	0,7009	-0,06	0,9877	-2,11	0,6834
β_{24}	0,43	0,8395	0,6	0,8387	-0,53	0,8061	-3,92	0,3250	-4,55	0,3852
β_{34}	0,54	0,8000	0,74	0,8000	**-4,93**	**0,0386**	-7,75	0,0655	-7,97	0,1408
β_{11}	-3,46	0,0824	-4,73	0,0823	**-6,49**	**0,0041**	**-9,89**	**0,0114**	**-13,07**	**0,0113**
β_{22}	2,33	0,2255	3,19	0,2249	2,03	0,2908	5,70	0,1109	7,26	0,1227
β_{33}	**-6,22**	**0,0053**	**-8,49**	**0,0053**	-3,39	0,0892	-6,46	0,0748	-3,59	0,4276
β_{44}	**-7,04**	**0,0023**	**-9,62**	**0,0023**	-1,74	0,3623	-4,56	0,1934	-3,91	0,3886
R^2	0,91		0,91		0,91		0,92		0,82	
R^2 adjust	0,80		0,80		0,80		0,82		0,61	
p - values	0,0003		0,0003		0,0004		0,0002		0,0120	
p - values lack of fit	0,5644		0,5638		0,3931		0,5547		0,4413	

Chữ in đậm thể hiện sự ảnh hưởng đáng kể của các biến (p < 0,05).

Đồng thời, giá trị *p of lack of fit* đều lớn hơn mức ý nghĩa thống kê, nghĩa là mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm. Điều này phù hợp để thiết lập mô hình thực nghiệm mô tả mối quan hệ giữa các biến khảo sát. Ngoài ra, các giá trị *p-value* của các mô hình đều nhỏ hơn *0,05,* chứng tỏ các phương trình hồi quy đều đạt độ tin cậy để mô tả ảnh hưởng của các biến. Nếu $p < 0,05$ thì hệ số hồi quy được xem là có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến mô hình, *p* càng nhỏ thì mức độ ảnh hưởng của biến càng lớn. Do đó, các phương trình hồi quy bậc hai mô tả ảnh hưởng của các thông số chiết UAE đối với TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của bột rễ ĐS được trình bày ở công thức *(3.1)* đến *(3.5)*.

$$\mathbf{Y_1 = 50,05 + 7,66X_1 - 4,47X_2 + 4,82X_3 + 4,81X_4} + 0,69X_1X_2 + 2,03X_1X_3 - 3,06X_2X_3 + 0,83X_1X_4 + 0,43X_2X_4 + 0,54X_3X_4 - 3,46X_1^2 + 2,33X_2^2 \mathbf{- 6,22X_3^2 - 7,04X_4^2} \quad (3.1)$$

$$\mathbf{Y_2 = 68,33 + 10,47X_1 - 6,1X_2 + 6,58X_3 + 6,56X_4} + 0,94X_1X_2 + 2,77X_1X_3 - 4,18X_2X_3 + 1,14X_1X_4 + 0,6X_2X_4 + 0,74X_3X_4 - 4,73X_1^2 + 3,19X_2^2 \mathbf{- 8,49X_3^2 - 9,62X_4^2} \quad (3.2)$$

$$\mathbf{Y_3 = 48,03 - 5,06X_1} - 2,22X_2 + \mathbf{6,96X_3 + 7,26X_4} + 1,95X_1X_2 - 0,40X_1X_3 + 0,91X_2X_3 - 0,83X_1X_4 - 0,53X_2X_4 - \mathbf{4,93X_3X_4 - 6,49\ X_1^2} + 2,03X_2^2 - 3,39X_3^2 - 1,74X_4^2 \quad (3.3)$$

$$\mathbf{Y_4 = 93,66 - 9,54X_1 - 6,28X_2 + 14,28X_3 + 13,26X_4} + 2,81X_1X_2 - 1,79X_1X_3 + 2,36X_2X_3 - 0,06X_1X_4 - 3,92X_2X_4 - 7,75X_3X_4 \mathbf{- 9,89X_1^2} + 5,70X_2^2 - 6,46X_3^2 - 4,56X_4^2 \quad (3.4)$$

$$Y_5 = \mathbf{85,26} - 3,53X_1 + 0,48X_2 + \mathbf{9,98X_3 + 12,94X_4} - 0,92X_1X_2 - 1,61X_1X_3 - 2,74X_2X_3 - 2,11X_1X_4 - 4,55X_2X_4 - 7,97X_3X_4 \mathbf{- 13,07X_1^2} + 7,26X_2^2 - 3,59X_3^2 - 3,91X_4^2 \quad (3.5)$$

b. Phân tích bề mặt đáp ứng

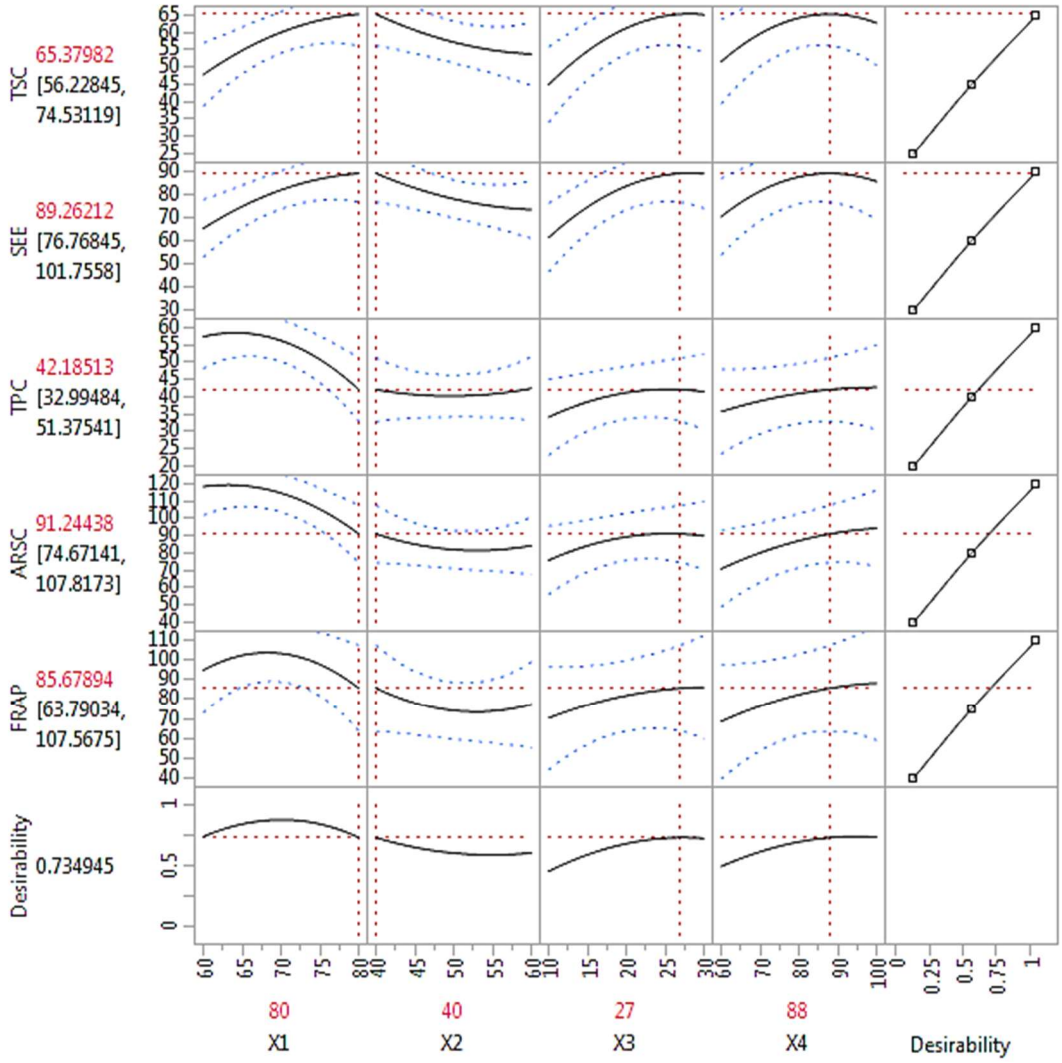
Hình 3.7 thể hiện ảnh hưởng đồng thời của bốn biến công nghệ gồm nồng độ ethanol (X_1), nhiệt độ chiết (X_2), thời gian chiết (X_3) và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (X_4) lên các hàm mục tiêu TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP. Có thể thấy các đáp ứng đều biến thiên theo dạng đường cong khi thay đổi điều kiện công nghệ. Điều này phù hợp với việc các phương trình *(3.1), (3.2), (3.3), (3.4), (3.5)* đều là mô hình hồi quy bậc hai, trong đó các thành phần bình phương của biến độc lập đóng vai trò quan trọng trong việc mô tả xu hướng phi tuyến tính của các đáp ứng.

Nồng độ ethanol (X_1) là biến có ảnh hưởng rõ rệt nhất, đặc biệt đối với TSC và SEE, khi các chỉ tiêu này tăng dần và đạt giá trị cao nhất trong khoảng 75-80%. Đối với TPC, xu hướng không tạo cực đại rõ rệt mà ổn định trong vùng 70-80%, cho thấy TPC đạt trạng thái cân bằng hòa tan trong khoảng này. Riêng ARSC cho thấy đỉnh tối ưu ở vùng 70-75%, sau đó có xu hướng giảm nhẹ khi tăng lên gần 80%, cho thấy nồng độ

ethanol quá cao có thể làm giảm tính hòa tan của một số flavonoid hoặc polyphenol có phân cực cao. Đối với FRAP, giá trị hầu như giữ ổn định trong vùng 70-80% ethanol và không nhạy với sự thay đổi nồng độ dung môi.

Khi nhiệt độ tăng, nhìn chung các hàm mục tiêu đều có xu hướng giảm. Nguyên nhân do nhiệt độ càng cao trong trích ly hỗ trợ sóng siêu âm làm tăng áp suất hơi của dung môi, làm giảm lực vỡ bọt khí và dẫn đến ảnh hưởng đến quá trình trích ly [212]. Ngoài ra, một số hợp chất sinh học có thể nhạy cảm với nhiệt độ, dẫn đến xu hướng giảm hoạt tính khi nhiệt độ tăng [239].

Khi thời gian tăng thì hiệu quả trích ly càng tốt vì tạo điều kiện để dung môi có thời gian xâm nhập giúp làm mềm mô thực vật, làm yếu cấu trúc thành tế bào, và phân hủy nhiều liên kết giữa các hợp chất, cũng như tăng cường tính hòa tan của các hoạt chất vào dung môi [305].



Hình 3. 7. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện sự ảnh hưởng của từng yếu tố tới TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của dịch chiết rễ ĐS

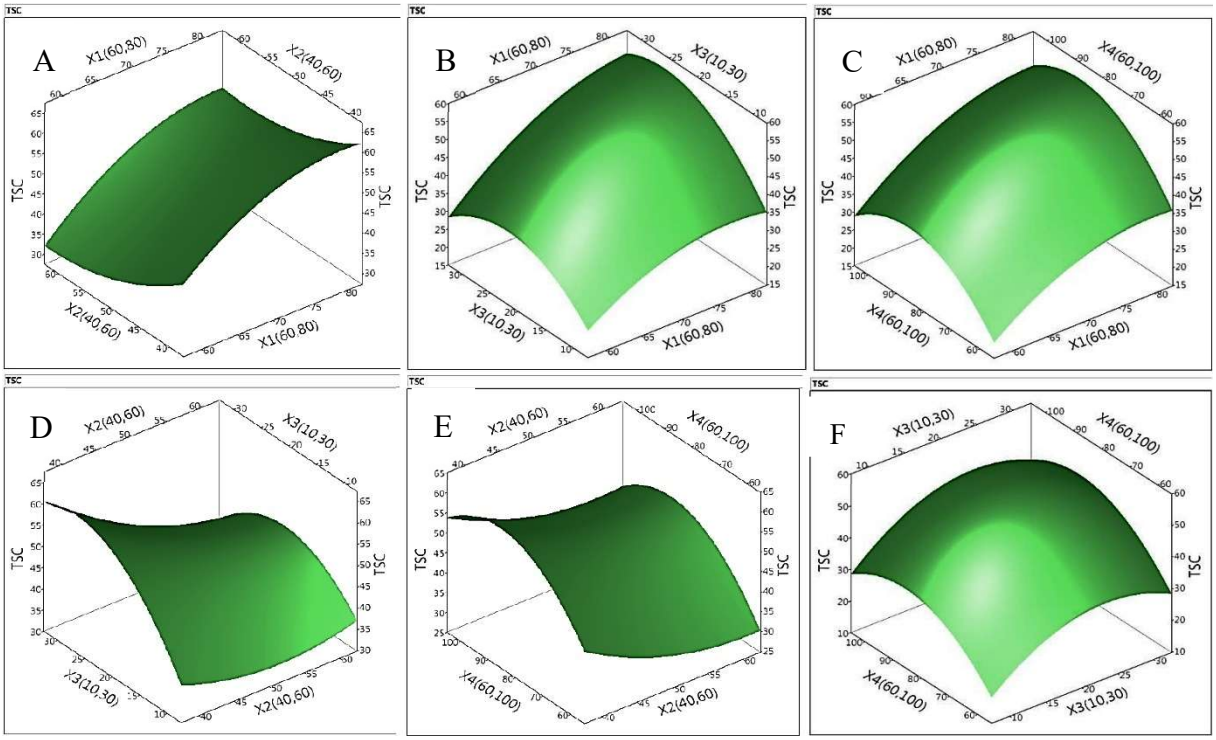
Các hàm mục tiêu đều tăng khi tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và sau đó giảm nhẹ. Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu càng lớn càng thúc đẩy quá trình khuếch tán vật chất từ trong nguyên liệu vào dung môi. Tuy nhiên, việc kéo dài thời gian để đạt trạng thái cân bằng sẽ tiêu tốn dung môi nhiều hơn [234].

Kết quả tối ưu cho thấy, khi xét đồng thời các yếu tố và tương tác giữa chúng, điểm tối ưu có xu hướng dịch chuyển về vùng biên của miền khảo sát. Điều này cho thấy hiệu quả của quá trình chiết không chỉ phụ thuộc vào từng yếu tố riêng lẻ mà còn phụ thuộc vào sự tương tác, thậm chí là tác động hiệp đồng giữa các yếu tố trong hệ.

Giá trị Desirability đạt khoảng 0,73 là kết quả của sự dung hòa giữa nhiều hàm mục tiêu vốn có xu hướng biến thiên đối nghịch nhau. Trong tối ưu hóa đa mục tiêu, việc đạt được Desirability tiệm cận 1 là rất khó khăn khi các biến số có sự xung đột về lợi ích kỹ thuật (ví dụ: nhiệt độ cao giúp tăng hiệu suất nhưng lại làm tăng nguy cơ phân hủy hoạt chất). Do đó, mức độ 0,73 chứng minh tính phù hợp và độ tin cậy của mô hình trong việc lựa chọn điều kiện chiết xuất hài hòa nhất, đảm bảo giá trị dược tính cao nhất cho dịch chiết

Dữ liệu thực nghiệm được xử lý theo mô hình đa thức bậc hai bằng phần mềm JMP 18. Vì giá trị SEE được tính từ TSC tương ứng so với TSC chiết kiệt (một hằng số), nên hình dạng bề mặt đáp ứng của SEE gần giống với TSC. Do đó, nghiên cứu tập trung trình bày các bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu chính là TSC (Hình 3.8).

Hình 3.8 A cho thấy TSC tăng khi nồng độ ethanol tăng kết hợp nhiệt độ càng giảm, phản ánh chiều hướng tác động tương đồng với phân tích đơn biến trước đó. Ở Hình 3.8 B và 3.8 C cho thấy sự tương đồng của xu hướng tác động đồng thời của hai cặp yếu tố nồng độ dung môi ethanol-thời gian trích ly và nồng độ dung môi ethanol-tỷ lệ dung môi/nguyên liệu. Ở nồng độ dung môi ethanol thấp, tương tác của hai cặp yếu tố này đến TSC tuân theo hình parabol ngược (tăng rồi giảm), tuy nhiên, khi nồng độ dung môi tăng dần, cùng với sự tăng thời gian trích ly và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thì TSC cũng tăng dần, đạt giá trị cao nhất tại thời gian 27 phút, nồng độ dung môi 80% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 88 mL/g. Hình 3.8 D và 3.8 E cho thấy thời gian hoặc tỷ lệ dung môi/nguyên liệu giảm, TSC suy giảm rõ rệt, bất kể nhiệt độ trích ly cao hay thấp. Hình 3.8 F chỉ ra rằng, khi thời gian trích ly tăng dần thì TSC tăng dần rồi sau đó lại giảm dần khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu giảm dần.



Hình 3. 8. Bề mặt đáp ứng 3D thể hiện sự ảnh hưởng của từng cặp yếu tố tới TSC

Tóm lại, điều kiện tối ưu thu được từ mô hình bề mặt đáp ứng là nồng độ ethanol 80%, nhiệt độ chiết 40 °C, thời gian chiết 27 phút, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 88 (mL/g).

c. Kiểm chứng

Thí nghiệm được lặp lại ba lần tại các điều kiện tối ưu, thu được giá trị TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP thực nghiệm như trình bày ở Bảng 3.14. So sánh với giá trị dự đoán từ phương trình hồi quy cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ mô hình tối ưu có độ tương thích cao với thực nghiệm và có thể ứng dụng để xác định điều kiện trích ly tối ưu cho rễ ĐS.

Bảng 3. 14. Kết quả hàm lượng tổng số hoạt chất, hiệu suất trích ly và khả năng chống oxy hóa dự đoán và thực nghiệm

Hàm mục tiêu	Giá trị dự đoán	Giá trị thực nghiệm
TSC (mg EE/g DM)	65,38^{a}	66,02 ± 1,02^{a}
SEE (%)	89,26^{b}	88,86 ± 1,24^{b}
TPC (mg GAE/g DM)	42,19^{c}	42,92 ± 0,04^{c}
ARSC (mg TE/g DM)	91,24^{d}	90,31± 0,09^{d}
FRAP (mg TE/g DM)	85,67^{e}	84,18 ± 0,03^{e}

Tóm lại, các nghiên cứu về điều kiện và tối ưu hóa quá trình chiết đã được thực hiện trên nhiều loài thực vật giàu hoạt chất, nhưng chưa có công bố tương tự đối với rễ ĐS. Do đó, việc so sánh trực tiếp còn hạn chế. Nghiên cứu của Sayem [215] tối ưu chiết siêu âm từ vỏ và hạt quả cóc cho thấy điều kiện tối ưu ở 59,82 °C, 41,08 phút và 76,64% ethanol. Khoang và cộng sự [125] xác định điều kiện chiết hỗ trợ siêu âm tối ưu cho rễ đinh lăng là ethanol 70%, công suất 185 W, 60 °C trong 65 phút. Trên quả táo tàu chua, ethanol cho hiệu suất TPC và TFC cao hơn, trong khi methanol cho TSC cao hơn [260] cho thấy dung môi ethanol có hiệu suất thu hồi TFC và TPC tốt hơn, còn dung môi methanol cho hiệu suất thu TSC cao hơn. Nghiên cứu chiết siêu âm [96] rễ Hoàng tinh đỏ ghi nhận điều kiện tối ưu gồm ethanol 85%, 50 °C, 75 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1:10 g/mL, cho hàm lượng saponin cao nhất.

3.2.2. Kết quả nghiên cứu điều kiện chiết thân rễ BLMH

3.2.2.1. Kết quả lựa chọn loại dung môi và phương pháp chiết thân rễ BLMH

Bảng 3.15 trình bày kết quả khảo sát riêng biệt ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết thân rễ BLMH.

Kết quả cho thấy ethanol 50% là dung môi chiết hiệu quả nhất, cho giá trị TSC, TPC, DRSC, ARSC và FRAP cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các dung môi khác. Thân rễ BLMH chứa các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau, trong đó đáng chú ý là saponin steroid và các hợp chất phenolic. Đây đều là những hợp chất có nhiều nhóm chức phân cực, đặc biệt là nhóm hydroxyl, nên cần dung môi có độ phân cực phù hợp để hòa tan hiệu quả. Khi sử dụng ethanol ở nồng độ quá cao, độ phân cực và hằng số điện môi của dung môi giảm (độ phân cực và hằng số điện môi của ethanol tinh khiết là 5,2 và 24,3), làm hạn chế khả năng hòa tan các hợp chất phân cực. Ngược lại, khi hàm lượng nước quá lớn, mặc dù khả năng hòa tan các hợp chất rất phân cực có thể tăng, nhưng hiệu quả hòa tan tổng thể đối với toàn bộ hệ hoạt chất có thể không tối ưu. Vì vậy, việc phối trộn ethanol với nước tạo ra sự cân bằng thích hợp hơn về độ phân cực, cho phép hòa tan đồng thời tốt hơn các hợp chất phân cực và bán phân cực [15]. Ngoài ra, ethanol là dung môi an toàn, chi phí thấp và phù hợp cho cả nghiên cứu lẫn ứng dụng công nghiệp. Do đó, hệ dung môi ethanol–nước được lựa chọn cho các nghiên cứu chiết tách tiếp theo.

Bảng 3. 15. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi và phương pháp chiết đến khả năng chiết thân rễ BLMH

Dung môi/ phương pháp chiết		TPC (mg GAE/g DM)	TSC (mg EE/g DM)	DRSC (mg TE/g DM)	ARSC (mg TE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
Dung môi	Nước	**0,78 ± 0,09^{ab}**	10,71 ± 0,80^{b}	**0,25 ± 0,02^{abc}**	2,13 ± 0,09^{b}	**0,82 ± 0,14^{a}**
	Me100	0,61 ± 0,07^{cd}	11,23 ± 0,48^{b}	0,20 ± 0,04^{bcd}	1,12 ± 0,14^{c}	0,41 ± 0,05^{c}
	Me50	0,45 ± 0,06^{e}	6,94 ± 0,20^{d}	**0,36 ± 0,10^{a}**	2,16 ± 0,49^{b}	0,61 ± 0,10^{b}
	E100	0,58 ± 0,02^{d}	8,54 ± 0,55^{c}	0,11 ± 0,01^{d}	0,68 ± 0,17^{d}	0,25 ± 0,02^{d}
	E50	**0,83 ± 0,04^{a}**	**19,43 ± 0,07^{a}**	**0,36 ± 0,05^{a}**	**3,66 ± 0,18^{a}**	**0,91 ± 0,08^{a}**
	AC100	0,13 ± 0,02^{g}	7,17 ±S 0,24^{d}	0,09 ± 0,07^{d}	0,26 ± 0,05^{e}	0,18 ± 0,01^{d}
	AC50	0,69 ± 0,04^{bc}	3,28 ± 0,10^{e}	0,17 ± 0,01^{cd}	0,72 ± 0,04^{d}	**0,81 ± 0,11^{a}**
	EA	0,28 ± 0,02^{f}	2,83 ± 0,10^{e}	0,16 ± 0,07^{cd}	0,12 ± 0,01^{e}	0,19 ± 0,03^{d}
	Cl	0,68 ± 0,05^{bc}	7,28 ± 0,32^{d}	0,30 ± 0,10^{ab}	0,74 ± 0,04^{d}	0,59 ± 0,05^{b}
Phương pháp chiết	CE	0,95 ± 0,13^{b}	9,52 ± 1,32^{c}	**0,38 ± 0,02^{a}**	1,32 ± 0,22^{b}	0,73 ± 0,12^{b}
	UAE	**1,24 ± 0,05^{a}**	12,42 ± 0,53^{b}	**0,40 ± 0,05^{a}**	1,55 ± 0,06^{b}	0,92 ± 0,12^{b}
	MAE	**1,32 ± 0,07^{a}**	**17,17 ± 0,27^{a}**	**0,41 ± 0,03^{a}**	**1,93 ± 0,17^{a}**	**1,23 ± 0,10^{a}**

Kết quả thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, các chữ cái trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%.

Phương pháp MAE cho hiệu quả chiết cao nhất, cả về hàm lượng hoạt chất (TSC, TPC) lẫn khả năng chống oxy hóa (DRSC, ARSC, FRAP). Hiệu quả này bắt nguồn từ cơ chế gia nhiệt thể tích của vi sóng. Dưới tác động của bức xạ vi sóng, các phân tử phân cực như nước trong mô nguyên liệu dao động mạnh theo cơ chế quay lưỡng cực và dẫn truyền ion, tạo ra nhiệt nhanh và trực tiếp trong toàn bộ khối mẫu. Sự gia nhiệt từ bên trong làm tăng áp suất nội bào, phá vỡ hoặc làm suy yếu cấu trúc tế bào, từ đó tạo điều kiện cho dung môi thâm nhập nhanh hơn và thúc đẩy quá trình thoát chất vào môi trường chiết. Đối với thân rễ BLMH là nguyên liệu có cấu trúc tương đối đặc chắc, cơ chế gia nhiệt nhanh và đồng đều này đặc biệt có lợi vì giúp tăng khả năng phá vỡ mô và giải phóng hoạt chất hiệu quả hơn so với các phương pháp chiết thông thường.

So với MAE, TSC của mẫu chiết bằng UAE thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$), cho thấy sóng siêu âm tuy hiệu quả với hợp chất phenolic nhưng kém hơn trong giải phóng saponin do cấu trúc glycosid bền, đòi hỏi năng lượng phá vỡ cao hơn.

Ngược lại, CE cho kết quả thấp nhất ở tất cả các chỉ tiêu. Điều này là do CE chủ yếu dựa vào sự khuếch tán thụ động của chất tan dưới tác động của chênh lệch nồng độ và gia nhiệt thông thường, nên khả năng phá vỡ cấu trúc mô hạn chế hơn, tốc độ truyền khối chậm hơn và hiệu quả thu nhận hoạt chất thấp hơn, mặc dù thời gian chiết kéo dài. So với CE, cả UAE và MAE đều giúp tăng cường quá trình chiết nhờ tác động trực tiếp lên cấu trúc tế bào; tuy nhiên, MAE thể hiện ưu thế rõ rệt hơn đối với nguyên liệu BLMH trong điều kiện nghiên cứu này.

Từ các kết quả trên có thể thấy, sự khác biệt về hiệu quả chiết không chỉ phụ thuộc vào đặc tính hóa lý của dung môi, mà còn liên quan chặt chẽ đến cơ chế truyền năng lượng và phá vỡ mô của từng phương pháp chiết. Vì vậy, MAE được lựa chọn là phương pháp chiết cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.2.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng các điều kiện chiết thân rễ BLMH

a. Nồng độ ethanol

Kết quả cho thấy khi tăng nồng độ ethanol, các giá trị TPC, TSC và FRAP có xu hướng tăng và đạt mức cao trong khoảng 50–70%, trong đó TSC đạt giá trị cao nhất tại 70%, còn TPC và FRAP đạt giá trị cao và tương đối ổn định trong khoảng này. Khi nồng độ ethanol tăng lên 90%, các chỉ tiêu đều giảm, cho thấy hiệu quả chiết suy giảm ở vùng dung môi có độ phân cực thấp hơn.

Xu hướng này phản ánh vai trò của độ phân cực hệ ethanol–nước đối với khả năng hòa tan và khuếch tán các hợp chất sinh học. Ở vùng nồng độ trung bình (50–70%), hệ dung môi có độ phân cực phù hợp để hòa tan đồng thời các hợp chất phân cực như saponin và phenolic, đồng thời vẫn duy trì khả năng làm trương nở cấu trúc mô nhờ sự hiện diện của nước. Khi nồng độ ethanol tăng cao, độ phân cực giảm và hàm lượng nước thấp làm hạn chế quá trình hydrat hóa và trương nở mô, từ đó làm giảm hiệu quả giải phóng hoạt chất.

Trong điều kiện MAE, hiệu quả của dung môi còn liên quan đến khả năng hấp thụ năng lượng vi sóng. Các hệ dung môi chứa nước có khả năng hấp thụ vi sóng tốt hơn, tạo ra gia nhiệt nhanh và tăng áp suất nội bào, góp phần phá vỡ cấu trúc mô và thúc đẩy quá trình thoát chất. Do đó, các hệ ethanol–nước ở nồng độ trung bình thường cho hiệu quả cao hơn so với ethanol nồng độ cao.

Vì vậy, nghiên cứu thu hẹp nồng độ ethanol trong khoảng 60–80% để bao quanh vùng có đáp ứng thuận lợi nhất, đồng thời loại bỏ các mức biên kém tiềm năng. Việc thu hẹp này cũng phù hợp với nguyên tắc xây dựng miền khảo sát trong RSM, giúp mô hình tập trung tốt hơn vào vùng có khả năng xuất hiện điểm tối ưu.

b. Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Kết quả cho thấy TSC và TPC tăng khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến 1/30 (g/mL), sau đó gần như không thay đổi đáng kể trong khoảng 1/30–1/50 (g/mL). Giá trị FRAP đạt cao nhất tại 1/40 (g/mL) nhưng không khác biệt rõ rệt so với các mức lân cận.

Xu hướng này cho thấy việc tăng lượng dung môi làm tăng chênh lệch nồng độ giữa dung môi và nguyên liệu, từ đó thúc đẩy quá trình khuếch tán hoạt chất. Tuy nhiên, khi lượng dung môi vượt quá mức cần thiết, hệ dần đạt trạng thái cân bằng, làm cho hiệu quả chiết không tiếp tục cải thiện rõ [15].

Trong điều kiện MAE, tỷ lệ dung môi còn ảnh hưởng đến khả năng truyền và phân bố năng lượng vi sóng trong hệ chiết. Lượng dung môi đủ lớn giúp phân bố nhiệt đồng đều và hạn chế hiện tượng quá nhiệt cục bộ, nhưng nếu quá dư thừa sẽ làm giảm hiệu quả sử dụng năng lượng và không cải thiện đáng kể hiệu suất chiết.

Do đó, tỷ lệ 1/30 (g/mL) được lựa chọn làm giá trị cố định cho giai đoạn tối ưu hóa, vì nằm trong vùng cho hiệu quả chiết cao, đồng thời giúp giảm lượng dung môi sử dụng và đảm bảo tính hợp lý của thiết kế thí nghiệm.

Bảng 3. 16. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến khả năng chiết thân rễ BLMH

Các yếu tố	Thông số	TPC (mg GAE/g DM)	TSC (mg EE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
Nồng độ dung môi (%)	30 (E30)	$0,36 \pm 0,03^{c}$	$15,78 \pm 0,52^{d}$	$0,26 \pm 0,05^{b}$
	50 (E50)	$0,52 \pm 0,01^{a}$	$23,11 \pm 0,65^{c}$	$0,40 \pm 0,08^{a}$
	70 (E70)	$\mathbf{0,53 \pm 0,03^{a}}$	$\mathbf{40,07 \pm 0,12^{a}}$	$\mathbf{0,43 \pm 0,08^{a}}$
	90 (E90)	$0,42 \pm 0,04^{b}$	$30,84 \pm 1,2^{c}$	$0,25 \pm 0,05^{b}$
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)	1/20	$0,44 \pm 0,06^{b}$	$37,68 \pm 0,52^{b}$	$0,43 \pm 0,09^{b}$
	1/30	$\mathbf{0,45 \pm 0,07^{ab}}$	$\mathbf{43,67 \pm 0,65^{ab}}$	$\mathbf{0,53 \pm 0,05^{b}}$
	1/40	$0,50 \pm 0,04^{ab}$	$39,25 \pm 0,12^{ab}$	$0,84 \pm 0,13^{a}$
	1/50	$0,56 \pm 0,03^{a}$	$44,44 \pm 1,2^{a}$	$0,74 \pm 0,09^{a}$
Thời gian chiết (phút)	10	$0,50 \pm 0,04^{a}$	$33,38 \pm 1,34^{b}$	$0,42 \pm 0,05^{a}$
	20	$\mathbf{0,51 \pm 0,05^{a}}$	$\mathbf{43,04 \pm 2,76^{a}}$	$\mathbf{0,47 \pm 0,02^{a}}$
	30	$0,55 \pm 0,02^{a}$	$40,85 \pm 5,22^{a}$	$0,49 \pm 0,03^{a}$
	40	$0,52 \pm 0,04^{a}$	$36,15 \pm 3,56^{ab}$	$0,43 \pm 0,07^{a}$
Thời gian bức xạ (giây)	2	$0,49 \pm 0,03^{d}$	$45,25 \pm 3,42^{b}$	$0,68 \pm 0,05^{b}$
	4	$0,52 \pm 0,12^{cd}$	$44,70 \pm 4,34^{b}$	$0,52 \pm 0,05^{c}$
	6	$0,60 \pm 0,03^{bc}$	$47,85 \pm 4,30^{b}$	$0,63 \pm 0,01^{b}$
	8	$\mathbf{0,69 \pm 0,03^{ab}}$	$\mathbf{57,18 \pm 1,82^{a}}$	$\mathbf{0,66 \pm 0,02^{b}}$
	10	$0,74 \pm 0,03^{a}$	$27,34 \pm 1,10^{c}$	$0,81 \pm 0,03^{a}$
	12	$0,66 \pm 0,02^{ab}$	$22,78 \pm 1,27^{c}$	$0,75 \pm 0,02^{a}$
Công suất vi sóng (W)	200	$0,83 \pm 0,04^{b}$	$37,16 \pm 0,46^{c}$	$0,72 \pm 0,04^{b}$
	400	$0,91 \pm 0,01^{a}$	$43,64 \pm 1,56^{b}$	$0,84 \pm 0,00^{a}$
	600	$\mathbf{0,92 \pm 0,03^{a}}$	$\mathbf{46,21 \pm 0,51^{a}}$	$\mathbf{0,94 \pm 0,05^{a}}$
	800	$0,93 \pm 0,02^{a}$	$44,98 \pm 0,08^{ab}$	$0,91 \pm 0,09^{a}$
	1000	$0,92 \pm 0,03^{a}$	$45,95 \pm 1,05^{a}$	$0,91 \pm 0,02^{a}$

Kết quả thể hiện (GTTB ± ĐLC), các ký tự a, b, c, d chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trung bình, $p<0,05$.

c. Thời gian chiết

Kết quả cho thấy TPC và FRAP hầu như không thay đổi theo thời gian chiết, trong khi TSC đạt giá trị cao nhất tại 20 phút và không cải thiện đáng kể khi kéo dài thời gian.

Xu hướng này cho thấy quá trình chiết diễn ra nhanh trong giai đoạn đầu nhờ chênh lệch nồng độ lớn và tác động gia nhiệt mạnh của vi sóng, sau đó hệ dần đạt trạng thái

cân bằng. Việc kéo dài thời gian chiết không mang lại lợi ích rõ rệt, thậm chí có thể làm tăng khả năng phân hủy hoặc biến đổi các hợp chất nhạy nhiệt.

Trong MAE, thời gian chiết liên quan trực tiếp đến tổng năng lượng cung cấp cho hệ; do đó, thời gian quá dài có thể gây quá nhiệt cục bộ và làm suy giảm chất lượng dịch chiết.

Do đó, khoảng thời gian 10–30 phút được lựa chọn cho giai đoạn tối ưu hóa nhằm bao quanh vùng có hiệu quả chiết thuận lợi và đảm bảo tính hợp lý về mặt kỹ thuật.

d. Thời gian bức xạ

Kết quả cho thấy TPC và FRAP đạt giá trị cao trong khoảng 8–12 giây/phút, trong khi TSC đạt cực đại tại 8 giây/phút. Khi thời gian bức xạ vượt quá 8 giây/phút, hiệu quả chiết không tiếp tục cải thiện rõ rệt.

Xu hướng này có thể liên quan đến đặc tính nguyên liệu BLMH chứa hàm lượng tinh bột đáng kể. Khi gia nhiệt kéo dài, tinh bột có thể trương nở và làm tăng độ nhớt của hệ, từ đó ảnh hưởng đến quá trình khuếch tán và thu nhận hoạt chất. Ngược lại, ở thời gian bức xạ thấp hơn, năng lượng cung cấp chưa đủ để hỗ trợ quá trình giải phóng hoạt chất từ cấu trúc mô thực vật.

Trong MAE, thời gian bức xạ quyết định chu kỳ gia nhiệt của hệ, do đó cần được tối ưu để vừa đảm bảo hiệu quả phá vỡ cấu trúc mô, vừa hạn chế hiện tượng quá nhiệt.

Do đó, khoảng 6–8 giây/phút được lựa chọn cho bước tối ưu hóa nhằm bao quanh vùng có hiệu quả chiết thuận lợi.

e. Công suất vi sóng

Công suất vi sóng là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chiết các hợp chất sinh học. Tuy nhiên, kết quả cho thấy các giá trị TSC, TPC và FRAP hầu như không thay đổi trong khoảng 600–1000 W. Điều này có thể do ở mức công suất khảo sát, hệ đã đạt đủ năng lượng cần thiết để phá vỡ cấu trúc mô và giải phóng hoạt chất, việc tăng công suất chỉ làm tăng tốc độ gia nhiệt nhưng không làm thay đổi đáng kể hiệu quả chiết.

Do đó, công suất 600 W được lựa chọn làm giá trị cố định cho các thí nghiệm tiếp theo, vì nằm trong vùng cho hiệu quả chiết cao, đồng thời giúp giảm tiêu hao năng lượng và đảm bảo tính hợp lý của thiết kế thí nghiệm.

Tóm lại, các khoảng biên được lựa chọn cho thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa gồm: phương pháp chiết MAE, công suất vi sóng 600 W, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 g/mL, nồng độ ethanol 60-80%, thời gian chiết 10-30 phút và thời gian bức xạ 6-8 giây/phút.

3.2.2.3. Kết quả tối ưu hóa điều kiện chiết thân rễ BLMH

a. Đánh giá sự tương thích của mô hình

Số liệu thực nghiệm thu được từ các thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết thân rễ BLMH theo ma trận thiết kế được tổng hợp và trình bày tại Phụ lục 5.2. Kết quả ANOVA và các hệ số của phương trình hồi quy tương ứng được trình bày trong Bảng 3.17.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy hệ số tương quan R^2 đạt giá trị cao đối với tất cả các hàm mục tiêu. Theo Andrich và cộng sự [26], mô hình được xem là đủ độ tin cậy khi $R^2 > 0,75$. Trong nghiên cứu này, R^2 của TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP lần lượt là 0,990; 0,990; 0,952; 0,995 và 0,913, nghĩa là 99,0%, 99,0%, 95,2%, 99,5% và 91,3% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán từ mô hình. Ngoài ra, theo Zolgharnein [306], sự khác biệt giữa R^2 dự đoán và R^2 điều chỉnh nên nhỏ hơn 0,20 để mô hình ổn định và có khả năng dự báo tốt. Kết quả cho thấy R^2 dự đoán trong nghiên cứu này phù hợp với R^2 hiệu chỉnh, do đó các mô hình TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP có khả năng dự đoán tốt.

Các mô hình TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP đều có $p < 0,05$, chứng tỏ các mô hình này đều đạt độ tin cậy để mô tả ảnh hưởng của các biến. Đồng thời, giá trị *p of lack of fit* của các mô hình TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP đều lớn hơn mức ý nghĩa thống kê, nghĩa là mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm. Điều này phù hợp để thiết lập mô hình thực nghiệm mô tả mối quan hệ giữa các biến khảo sát.

Bảng 3. 17. Các hệ số của phương trình hồi quy và kết quả phân tích phương sai

Hệ số hồi quy	TSC (Y_1)		SEE (Y_2)		TPC (Y_3)		ARSC (Y_4)		FRAP (Y_5)	
	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*	Dự đoán	*p - values*
β_0	**50,23**	**<0,0001**	**62,98**	**<,0001**	**0,84**	**<0,0001**	**5,10**	**<0,0001**	**1,23**	**<0,0001**
β_1	**8,55**	**<0,0001**	**10,71**	**<,0001**	-0,005	0,4896	**-0,37**	**<0,0001**	**0,06**	**0,0051**
β_2	**3,39**	**0,0007**	**4,25**	**0,0007**	**0,04**	**0,0019**	**0,09**	**0,0056**	**0,04**	**0,0250**
β_3	0,41	0,4061	0,52	0,4045	**0,035**	**0,0034**	**0,13**	**0,0013**	0,01	0,3532
β_{12}	-0,26	0,7047	-0,32	0,7049	**0,03**	**0,0250**	0,06	0,0891	0,01	0,7094
β_{13}	**3,33**	**0,0035**	**4,18**	**0,0035**	**0,025**	**0,0462**	0,06	0,0798	-0,05	0,0641
β_{23}	0,45	0,5187	0,56	0,5172	-0,01	0,3401	**0,08**	**0,0340**	0,02	0,2897
β_{11}	**3,10**	**0,0056**	**3,88**	**0,0056**	**-0,03**	**0,0217**	**-0,65**	**<0,0001**	**-0,06**	**0,0389**
β_{22}	**-3,17**	**0,0051**	**-3,98**	**0,0051**	-0,02	0,0717	-0,07	0,0694	-0,04	0,1165
β_{33}	**2,07**	**0,0268**	**2,60**	**0,0268**	0,01	0,2613	0,05	0,1583	-0,03	0,1898
R^2	0,990		0,990		0,952		0,995		0,913	
R^2 adjust	0,972		0,972		0,866		0,985		0,757	
p - values	0,0002		0,0002		0,0083		< 0,0001		0,0330	
P - values Lack of fit	0,0677		0,0670		0,8952		0,5474		0,1219	

Chữ in đậm thể hiện sự ảnh hưởng đáng kể của các biến ($p < 0,05$).

Như vậy, các phương trình mô tả tác động của các thông số UAE đối với TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của mẫu bột thân rễ BLMH như sau:

$$\mathbf{Y_1 = 50,23 + 8,55X_1 + 3,39X_2} + 0,41X_3 - 0,26X_1X_2 + \mathbf{3,33X_1X_3} + 0,45X_2X_3 + \mathbf{3,1X_1^2 - 3,17X_2^2 + 2,07X_3^2} \quad (3.6)$$

$$\mathbf{Y_2 = 62,98 + 10,71X_1 + 4,25X_2} + 0,52X_3 - 0,32X_1X_2 + \mathbf{4,18X_1X_3} + 0,56X_2X_3 + \mathbf{3,88X_1^2 - 3,98X_2^2 + 2,60X_3^2} \quad (3.7)$$

$$\mathbf{Y_3 = 0,84} - 0,005X_1 + \mathbf{0,04X_2 + 0,035X_3 + 0,03X_1X_2 + 0,025X_1X_3} - 0,01X_2X_3 - \mathbf{0,03X_1^2} - 0,02X_2^2 + 0,01X_3^2 \quad (3.8)$$

$$\mathbf{Y_4 = 5,1 - 0,37X_1 + 0,09X_2 + 0,13X_3} + 0,06X_1X_2 + 0,06X_1X_3 + \mathbf{0,08X_2X_3 - 0,65X_1^2} - 0,07X_2^2 + 0,05X_3^2 \quad (3.9)$$

$$\mathbf{Y_5 = 1,23 + 0,06X_1 + 0,04X_2} + 0,01X_3 + 0,01X_1X_2 - 0,05X_1X_3 + 0,02X_2X_3 - \mathbf{0,06X_1^2} - 0,04X_2^2 - 0,03X_3^2 \quad (3.10)$$

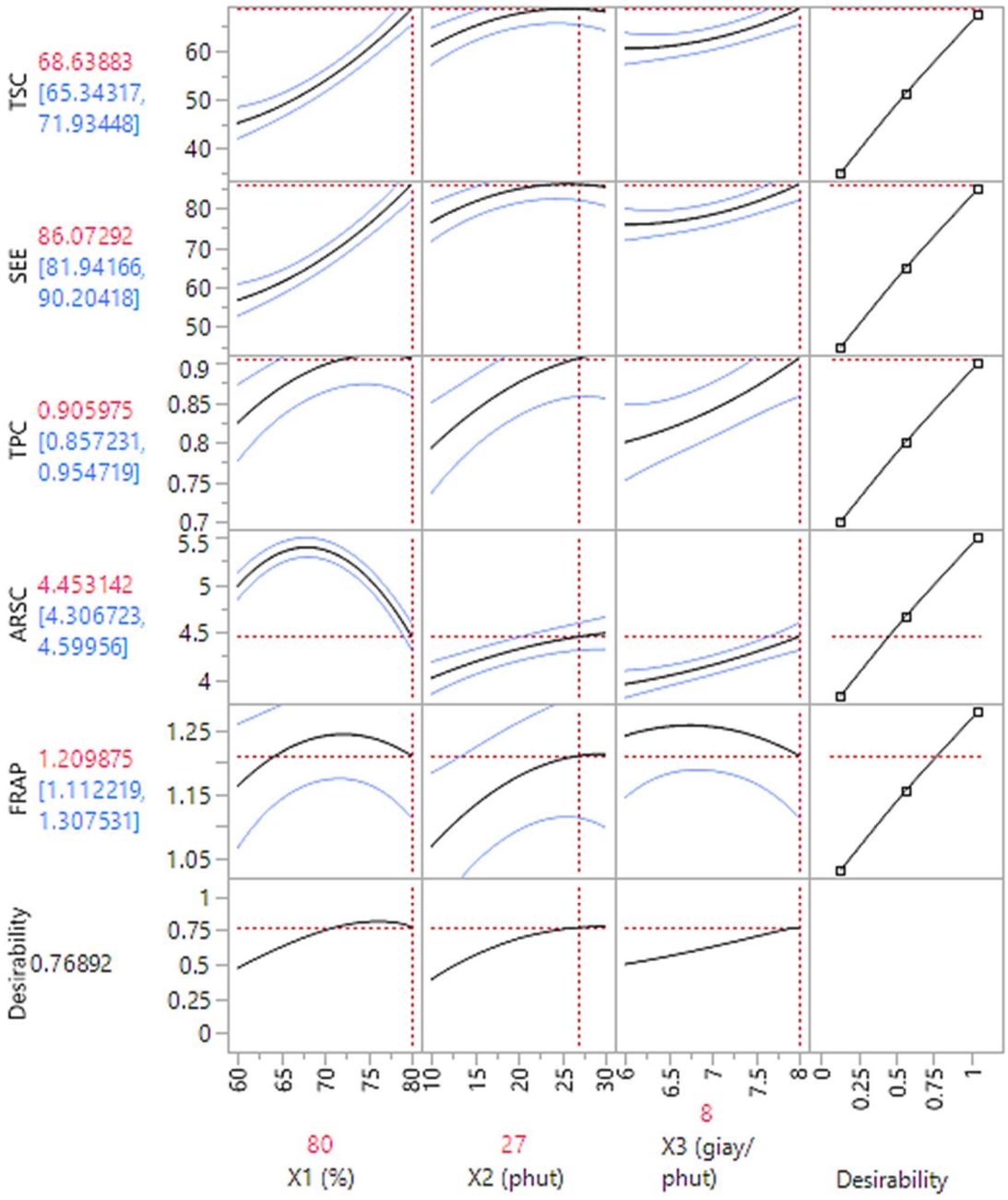
b. Phân tích bề mặt đáp ứng

Chiều hướng tác động của các yếu tố khảo sát đến các hàm mục tiêu được thể hiện ở Hình 3.9. Kết quả cho thấy tất cả các biến đầu vào đều ảnh hưởng đến đáp ứng theo dạng phi tuyến, phù hợp với dạng hàm hồi quy bậc hai đã được thiết lập trong các phương trình *(3.6), (3.7), (3.8), (3.9)* và *(3.10)*.

Khi nồng độ ethanol tăng dần, các giá trị TSC, SEE và TPC đều có xu hướng tăng. Nguyên nhân là ở nồng độ ethanol thấp, độ phân cực của hệ dung môi vẫn còn cao, dẫn đến khả năng hòa tan các hợp chất kém phân cực hoặc bán phân cực bị hạn chế. Khi tăng nồng độ ethanol, độ phân cực dung môi được điều chỉnh đến mức phù hợp, giúp phá vỡ màng tế bào tốt hơn và tăng cường giải phóng hoạt chất ra môi trường chiết. Tuy nhiên, các chỉ tiêu thể hiện hoạt tính chống oxy hóa chỉ tăng đến khoảng 70% ethanol, sau đó giảm khi tiếp tục tăng nồng độ dung môi. Điều này cho thấy ở nồng độ ethanol quá cao, khiến khả năng hòa tan các hợp chất phenolic có tính phân cực cao – vốn đóng vai trò chính trong hoạt tính chống oxy hóa – bị suy giảm. Do đó, hoạt tính chống oxy hóa có xu hướng giảm khi vượt quá mức ethanol tối ưu.

Khi thời gian chiết và thời gian bức xạ tăng, hầu hết các hàm mục tiêu (TSC, SEE, TPC, ARSC) đều tăng, chỉ FRAP hơi giảm nhẹ. Việc tăng thời gian xử lý giúp dung môi thẩm thấu sâu hơn vào mô thực vật, làm mềm thành tế bào và phá vỡ các liên kết giữa polysaccharide – protein – hợp chất thứ cấp, từ đó tăng cường khuếch tán hoạt chất ra môi trường chiết [305]. Đồng thời, sự gia tăng nhiệt độ trong mô cũng góp phần phá vỡ

cấu trúc tế bào và thúc đẩy quá trình giải phóng các hợp chất sinh học. Tuy nhiên, khi thời gian chiết và bức xạ tiếp tục kéo dài, nhiệt tích lũy có thể làm giảm khả năng chống oxy hóa (đặc biệt FRAP) do một phần polyphenol bị oxy hóa nhiệt hoặc phân hủy

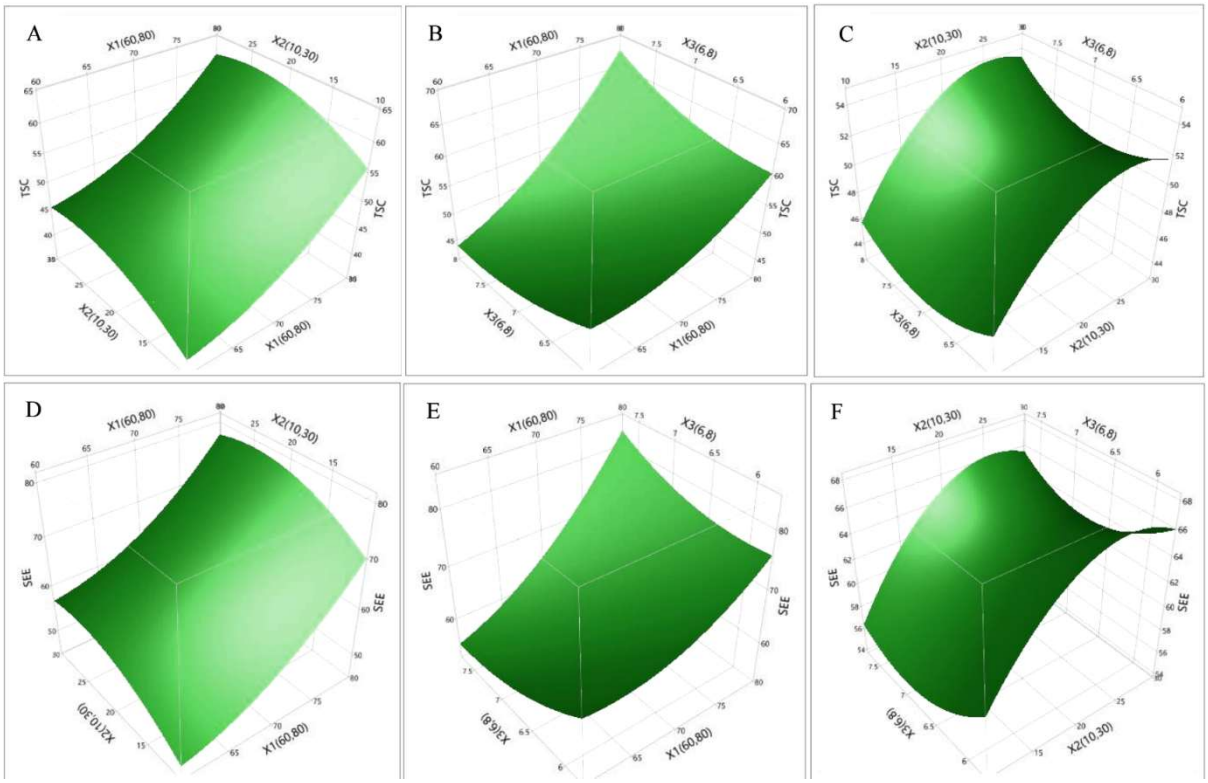


Hình 3. 9. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện sự ảnh hưởng của từng yếu tố tới TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP của thân rễ BLMH

Kết quả tối ưu cho thấy, hiệu quả của quá trình chiết không chỉ phụ thuộc vào từng yếu tố riêng lẻ mà còn phụ thuộc vào sự tương tác, thậm chí là tác động hiệp đồng giữa các yếu tố trong hệ. Giá trị Desirability đạt khoảng 0,77 là kết quả của sự dung hòa giữa nhiều hàm mục tiêu vốn có xu hướng biến thiên đối nghịch nhau. Trong tối ưu hóa đa mục tiêu, việc đạt được Desirability tiệm cận 1 là rất khó khăn khi các biến số có sự

xung đột về lợi ích kỹ thuật. Do đó, mức độ 0,77 chứng minh tính phù hợp và độ tin cậy của mô hình trong việc lựa chọn điều kiện chiết xuất hài hòa nhất, đảm bảo giá trị dược tính cao nhất cho dịch chiết.

Dữ liệu thực nghiệm được xử lý theo mô hình đa thức bậc hai bằng phương pháp RSM trên phần mềm JMP 18. Trong hai hàm mục tiêu chính, giá trị SEE được tính từ TSC tương ứng so với TSC chiết kiệt (hằng số) (phương trình 2), nên các bề mặt đáp ứng của SEE có dạng tương tự như TSC. Vì vậy, nghiên cứu tập trung trình bày các bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu chính là TSC (Hình 3.10).



Hình 3. 10. Bề mặt đáp ứng 3D thể hiện ảnh hưởng của từng cặp yếu tố tới TSC

Hình 3.10 A cho thấy khi thời gian chiết còn ngắn, việc tăng nồng độ ethanol chỉ làm TSC tăng nhẹ, do dung môi chưa có đủ thời gian thẩm thấu và phá vỡ cấu trúc tế bào. Tuy nhiên, khi kết hợp nồng độ ethanol cao và thời gian chiết dài, hiệu quả giải phóng saponin được tăng cường rõ rệt, giúp TSC đạt gần giá trị cực đại.

Hình 3.10 B thể hiện sự tương tác giữa nồng độ dung môi và thời gian bức xạ, TSC tăng mạnh hơn khi cả hai yếu tố này cùng tăng đến vùng tối ưu, cho thấy tác dụng hiệp lực giữa phân cực dung môi và năng lượng vi sóng trong quá trình giải phóng hợp chất.

Ngược lại, Hình 3.10 C cho thấy khi thời gian chiết và thời gian bức xạ đều tăng quá mức, TSC tạo dạng bề mặt đáp ứng lõm, tức giảm nhẹ trước khi tăng trở lại. Hiện

tượng này có thể là do nhiệt tích lũy làm cấu trúc tế bào bị co rút hoặc tăng độ nhớt dịch chiết, tạm thời cản trở sự khuếch tán hoạt chất ra ngoài; sau đó nhiệt năng tiếp tục phá vỡ mô sâu hơn, giúp TSC tăng trở lại ở vùng cao hơn của miền khảo sát.

Hình 3.10 D, 3.10 E và 3.10 F trình bày bề mặt đáp ứng của SEE. Do SEE được tính bằng TSC chia cho hàm lượng saponin chiết kiệt (giá trị hằng số), nên xu hướng thay đổi của SEE theo từng cặp yếu tố tương tự với TSC, phản ánh cùng cơ chế chiết tách.

Tóm lại, điều kiện tối ưu thu được từ mô hình bề mặt đáp ứng là nồng độ dung môi ethanol 80%; thời gian trích ly 27 phút, thời gian bức xạ 8 giây/phút.

c. Kiểm chứng

Thí nghiệm được lặp lại ba lần tại các điều kiện tối ưu, thu được giá trị TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP thực nghiệm như trình bày trong Bảng 3.18. So sánh với giá trị dự đoán từ phương trình hồi quy cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ mô hình tối ưu có độ phù hợp cao với thực nghiệm và có thể ứng dụng để xác định điều kiện chiết tối ưu cho thân rễ BLMH.

Bảng 3.18. Kết quả hàm lượng hàm lượng hoạt chất, hiệu suất trích ly và khả năng chống oxy hóa dự đoán và thực nghiệm

Hàm mục tiêu	Giá trị dự đoán	Giá trị thực nghiệm
TSC (mg EE/g DM)	$68,64^{a}$	$68,02 \pm 1,02^{a}$
SEE (%)	$86,07^{b}$	$85,40 \pm 1,24^{b}$
TPC (mg GAE/g DM)	$0,91^{c}$	$0,92 \pm 0,04^{c}$
ARSC (mg TE/g DM)	$4,45^{d}$	$4,31 \pm 0,09^{d}$
FRAP (mg TE/g DM)	$1,21^{e}$	$1,18 \pm 0,03^{e}$

Tóm lại, điều kiện và tối ưu hóa quá trình chiết đối với thân rễ BLMH chưa từng được nghiên cứu trước đây, nên việc so sánh trực tiếp với các loài thực vật khác còn hạn chế. Tuy nhiên, so với các nghiên cứu tối ưu hóa chiết trên các đối tượng khác, kết quả thu được cho thấy xu hướng tương đồng: hiệu quả chiết cao đạt được khi sử dụng hỗn hợp dung môi ethanol–nước ở nồng độ trung bình và công suất vi sóng ở mức vừa phải.

Kết quả tối ưu hóa chiết MAE vỏ ca cao [170] cũng cho thấy các điều kiện chiết khá tương tự như nồng độ methanol 85%, công suất vi sóng 600 W, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/50 g/mL, thời gian chiết 40 phút và thời gian bức xạ 6 giây/phút. Kết quả tối ưu chiết MAE Nhân sâm [133] để thu saponin cho thấy hàm lượng saponins thô

thu được chịu ảnh hưởng lớn của nồng độ dung môi chiết và thời gian chiết, cụ thể là tại nồng độ ethanol 77,3% và 295,1 giây. Kết quả tối ưu điều kiện chiết MAE vỏ quả bồ hòn [67] cho thấy nồng độ ethanol 40%, thời gian chiết 13 phút, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1/19 g/mL ở công suất vi sóng 425 W cho hiệu quả chiết saponin tối ưu và vượt trội phương pháp chiết truyền thống. Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết MAE đối với lá chùm ngây [89] cho thấy kết quả điều kiện chiết MAE: công suất 600 W, trong 30 phút, nhiệt độ 40 °C đạt SEE và TPC cao nhất, cũng cho thấy ưu điểm vượt trội về nhiều mặt của MAE so với CE. Nghiên cứu tối ưu hóa chiết MAE hành lá [28] cho thấy điều kiện chiết tối ưu dự đoán là nhiệt độ 60 °C, thời gian 22 phút, nồng độ ethanol 51% (v/v), và lượng dung môi sử dụng là 11 mL/g nguyên liệu. Tối ưu hóa chiết MAE từ vỏ và hạt nho [29] cho thấy điều kiện chiết tối ưu là methanol 65%, 1/50 g/mL, công suất vi sóng 500 W và thời gian chiết 5 phút.

3.3. Kết quả đánh giá các tính chất của bột vi bao rễ ĐS và thân rễ BLMH

3.3.1. Kết quả phân tích bột vi bao rễ ĐS

Kết quả đánh giá tính chất hóa lý, hoạt chất sinh học của bột vi bao và hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu bột vi bao ĐS được thể hiện trong Bảng 3.19.

3.3.1.1. Kết quả xác định tính chất hóa lý của bột vi bao ĐS

Khi tăng lượng chất bao màng thì độ ẩm và hoạt độ nước của bột vi bao có xu hướng giảm đáng kể ($p < 0,05$), trong đó công thức 40/60 với tỷ lệ MD/GA/MCS/PEC = 5/1/3/1 (CT9) cho giá trị thấp nhất (5,79% và a_w = 0,499). Điều này cho thấy việc tăng lượng chất bao màng làm giảm hàm lượng nước tự do trong hỗn hợp trước sấy, đồng thời tạo nên ma trận có khả năng cố định nước nội tại, từ đó làm suy giảm aw sau sấy. Hàm lượng MD cao góp phần hình thành cấu trúc thủy tinh [78] có tính chống hút ẩm, hạn chế sự di động phân tử của nước. GA với cấu trúc arabinogalactan phân nhánh giúp cải thiện tính ổn định bề mặt và giảm hấp thụ ẩm [72], trong khi PEC tạo mạng lưới hydrogen bền giúp giảm nước tự do và duy trì aw thấp [91, 163]. Kết quả tương đồng với nhận định của Deng và cộng sự [69] khi cho thấy sử dụng vật liệu bao màng đều có tác dụng giảm ẩm và hoạt độ nước.

Bảng 3. 19. Kết quả phân tích các tính chất của bột vi bao ĐS

STT	Tỷ lệ dịch cô/ chất bao màng	MD/GA/ MCS/PEC	Độ ẩm (%)	Hoạt độ nước (a_w)	Năng suất bao màng (%)	Độ hòa tan (%)	TSC (mg EE/g DM)	TPC (mg GAE/g DM)	FRAP (mg TE/g DM)
1	**60/40**	**4/1/4/1**	$6,64 \pm 0,25^{abc}$	$0,516 \pm 0,003^{ab}$	$74,38 \pm 1,13^{b}$	$43,19 \pm 1,44^{ab}$	$140,10 \pm 4,69^{f}$	$57,98 \pm 1,56^{c}$	$156,56 \pm 1,91^{g}$
2		**3/1/5/1**	$6,82 \pm 0,24^{ab}$	$0,515 \pm 0,003^{abc}$	$76,07 \pm 1,70^{b}$	$40,07 \pm 2,5^{bc}$	$150,30 \pm 1,26^{e}$	$54,37 \pm 1,37^{d}$	$157,95 \pm 4,47^{g}$
3		**5/1/3/1**	$6,51 \pm 0,24^{bc}$	$0,512 \pm 0,003^{abcd}$	$77,68 \pm 1,70^{b}$	$40,52 \pm 2,06^{bc}$	$127,20 \pm 2,28^{g}$	$38,59 \pm 1,29^{f}$	$103,13 \pm 3,07^{h}$
4	**50/50**	**4/1/4/1**	$6,51 \pm 0,28^{bc}$	$0,514 \pm 0,003^{abc}$	$68,27 \pm 2,18^{c}$	$42,98 \pm 1,83^{ab}$	$241,00 \pm 1,72^{b}$	$50,12 \pm 0,47^{e}$	$173,80 \pm 1,79^{f}$
5		**3/1/5/1**	$6,54 \pm 0,34^{bc}$	$0,508 \pm 0,003^{bcde}$	$85,05 \pm 2,12^{a}$	$42,98 \pm 1,48^{ab}$	$237,40 \pm 1,14^{b}$	$49,39 \pm 0,49^{e}$	$196,25 \pm 1,31^{d}$
6		**5/1/3/1**	$6,23 \pm 0,29^{cd}$	$0,502 \pm 0,003^{de}$	$73,06 \pm 2,18^{b}$	$43,38 \pm 1,55^{ab}$	$216,60 \pm 2,21^{d}$	$52,08 \pm 0,43^{de}$	$182,94 \pm 3,86^{e}$
7	**40/60**	**4/1/4/1**	$6,36 \pm 0,25^{bc}$	$0,505 \pm 0,004^{cde}$	$76,07 \pm 2,12^{b}$	$43,97 \pm 2,59^{ab}$	$237,40 \pm 1,97^{b}$	$55,15 \pm 4,12^{cd}$	$178,31 \pm 4,58^{ef}$
8		**3/1/5/1**	$6,25 \pm 0,15^{cd}$	$0,502 \pm 0,003^{de}$	$82,33 \pm 2,26^{a}$	$46,72 \pm 1,27^{a}$	$262,80 \pm 3,58^{a}$	$52,24 \pm 1,49^{de}$	$237,10 \pm 6,1^{c}$
9		**5/1/3/1**	**$5,79 \pm 0,3^{d}$**	**$0,499 \pm 0,004^{e}$**	**$86,47 \pm 1,70^{a}$**	**$47,09 \pm 2,64^{a}$**	**$264,70 \pm 2,9^{a}$**	**$77,44 \pm 1,98^{b}$**	**$296,59 \pm 2,68^{b}$**
0*	**Không bao màng**	**0**	$7,11 \pm 0,5^{a}$	$0,521 \pm 0,005^{a}$	ND	$37,15 \pm 3,18^{c}$	$267,40 \pm 0,28^{a}$	$88,57 \pm 3,27^{a}$	$315,11 \pm 2,52^{a}$

Kết quả thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể ($p<0,05$); TSC: hàm lượng saponins tổng số; TPC: hàm lượng phenolics tổng số; FRAP: hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt; EE: tương đương với escin; GAE: tương đương với gallic acid; TE: tương đương với trolox; Mẫu 0: mẫu đối chứng (không thực hiện bao màng). ND: không xác định.

Công thức 9 (40/60-5/1/3/1) đạt giá trị năng suất bao màng cao nhất (86,47%), và độ hòa tan (47,09%) tương đối cao so với các công thức khảo sát, chứng tỏ cấu trúc màng bao hình thành ở tỷ lệ 5/1/3/1 là cân bằng giữa tính linh hoạt và độ bền cơ học. Khả năng hòa tan tốt của công thức này có liên quan trực tiếp đến vai trò của MD trong việc tạo dựng cấu trúc hạt xốp, làm tăng diện tích tiếp xúc và giảm trở lực khuếch tán khi tiếp xúc với dung môi. Bên cạnh đó, sự hiện diện của GA hỗ trợ quá trình làm ướt và phân tán nhanh chóng, giúp hỗn hợp tan hoàn toàn mà không bị vón cục.

Do đó, công thức tỷ lệ dịch cô/hỗn hợp chất bao màng 40/60, tỷ lệ các chất bao màng MD/GA/MCS/PEC 5/1/3/1 được xem là phù hợp để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo trong phạm vi nghiên cứu.

3.3.1.2. Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa của bột vi bao ĐS

Kết quả ở Bảng 3.19 cho thấy tỷ lệ phối trộn dịch cô/hỗn hợp chất bao màng ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng giữ lại hoạt chất sinh học (TSC và TPC) và năng lực chống oxy hóa (FRAP) của bột vi bao. Nhìn chung, mẫu không bao màng (0*) có giá trị TSC, TPC và FRAP cao nhất do không bị pha loãng lõi khi bao màng. Tuy nhiên, điều này không đồng nghĩa với việc chất lượng sản phẩm tối ưu, vì mẫu này có độ ẩm và hoạt độ nước cao hơn, dễ xảy ra oxy hóa và suy giảm hoạt chất trong quá trình bảo quản.

Ở tỷ lệ dịch cô/chất bao 60/40, các mẫu 4, 5, 6 có giá trị TSC, TPC và FRAP thấp nhất trong số các mẫu có bao màng. Nguyên nhân là do hàm lượng dịch cô cao làm tăng tỷ lệ lõi, trong khi lượng chất bao không đủ để hình thành mạng lưới polymer hoàn chỉnh và liên tục quanh các cấu tử hoạt tính. Khi đó, các hợp chất sinh học chỉ được giữ lại một phần trong ma trận, còn một phần nằm gần bề mặt hạt hoặc phân bố trong những vùng mà lớp bao mỏng và kém đồng nhất. Trong quá trình sấy, nước thoát ra nhanh từ hệ có hàm lượng lõi cao có thể tạo nên các vi khe nứt hoặc lỗ rỗng trong cấu trúc hạt, làm tăng khả năng khuếch tán oxy vào bên trong và thúc đẩy sự thất thoát hoặc phân hủy các hợp chất nhạy cảm. Đồng thời, với mật độ lõi lớn, các tương tác bảo vệ giữa hoạt chất với vật liệu bao như liên kết hydro, tương tác kỵ nước và sự giữ cơ học trong ma trận polymer không đủ mạnh để ổn định toàn bộ hệ vi bao.

Ở tỷ lệ 50/50, kết quả được cải thiện rõ rệt hơn do lượng chất bao tăng lên, tạo điều kiện hình thành mạng lưới polymer ổn định và liên tục hơn quanh dịch chiết. Khi đó, các thành phần như MD, GA, MCS và PEC có khả năng phối hợp tốt hơn trong việc

tạo màng và giữ hoạt chất. MD góp phần tạo ma trận vô định hình, làm giảm hiện tượng dính và hỗ trợ cố định hoạt chất trong cấu trúc khô; GA giúp tăng khả năng nhũ hóa và phân tán các cấu tử kém phân cực; trong khi MCS và PEC tham gia gia cố mạng lưới thông qua liên kết hydro và các tương tác giữa các chuỗi polymer. Nhờ đó, hoạt chất được phân bố đồng đều hơn trong hệ, hạn chế sự tập trung ở bề mặt hạt và giảm mức độ tiếp xúc trực tiếp với nhiệt và oxy. Tuy vậy, tỷ lệ lõi vẫn còn tương đối cao nên trong quá trình sấy, sự co rút cấu trúc và thoát ẩm vẫn có thể gây tổn thất một phần hoạt chất.

Ở tỷ lệ 40/60, pha bao chiếm ưu thế nên mạng lưới vi bao được hình thành đầy đủ hơn, với lớp màng bao dày, đồng nhất và bền vững hơn. Trong điều kiện này, các hoạt chất sinh học trong dịch chiết ĐS được giữ lại hiệu quả hơn nhờ nhiều cơ chế phối hợp [58]: (i) bị cố định vật lý trong ma trận polymer; (ii) được bảo vệ khỏi oxy và ánh sáng bởi lớp bao liên tục; và (iii) được ổn định thông qua các tương tác phân tử giữa hoạt chất và vật liệu bao. Đối với các hợp chất phenolic, các nhóm hydroxyl có thể hình thành liên kết hydro với PEC, GA hoặc MCS, giúp giảm mức độ tiếp xúc với môi trường oxy hóa. Đối với các hợp chất kém phân cực như tanshinone (nhóm diterpen quinone trong Đan sâm), do độ tan trong nước thấp, chúng có xu hướng liên kết với các vùng kỵ nước của GA (các đoạn polypeptide) hoặc tương tác với cấu trúc xoắn amylose của MCS, hình thành các dạng "neo kỵ nước" hoặc phức bao. Các tương tác này giúp giữ các phân tử tanshinone bên trong mạng lưới polymer, hạn chế sự khuếch tán ra bề mặt và giảm thất thoát trong quá trình sấy.

Có thể thấy rõ ở nhóm này, các mẫu 7, 8, 9 đều cho giá trị TSC, TPC và FRAP cao nhất trong số các mẫu có bao màng. Trong đó, mẫu 9 với tỷ lệ MD/GA/MCS/PEC là 5/1/3/1 cho kết quả nổi bật nhất. Điều này cho thấy tỷ lệ phối hợp này đã tạo được sự cân bằng phù hợp giữa khả năng tạo ma trận, nhũ hóa, gia cố cấu trúc và ổn định hoạt chất.

Tóm lại, mẫu 9 với tỷ lệ dịch cô/hỗn hợp chất bao màng 40/60 và tỷ lệ MD/GA/MCS/PEC là 5/1/3/1 cho hiệu quả tối ưu, vừa đảm bảo khả năng bảo lưu hoạt chất sinh học, vừa nâng cao độ ổn định và tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

3.3.1.3. Kết quả đo cấu trúc - hình thái

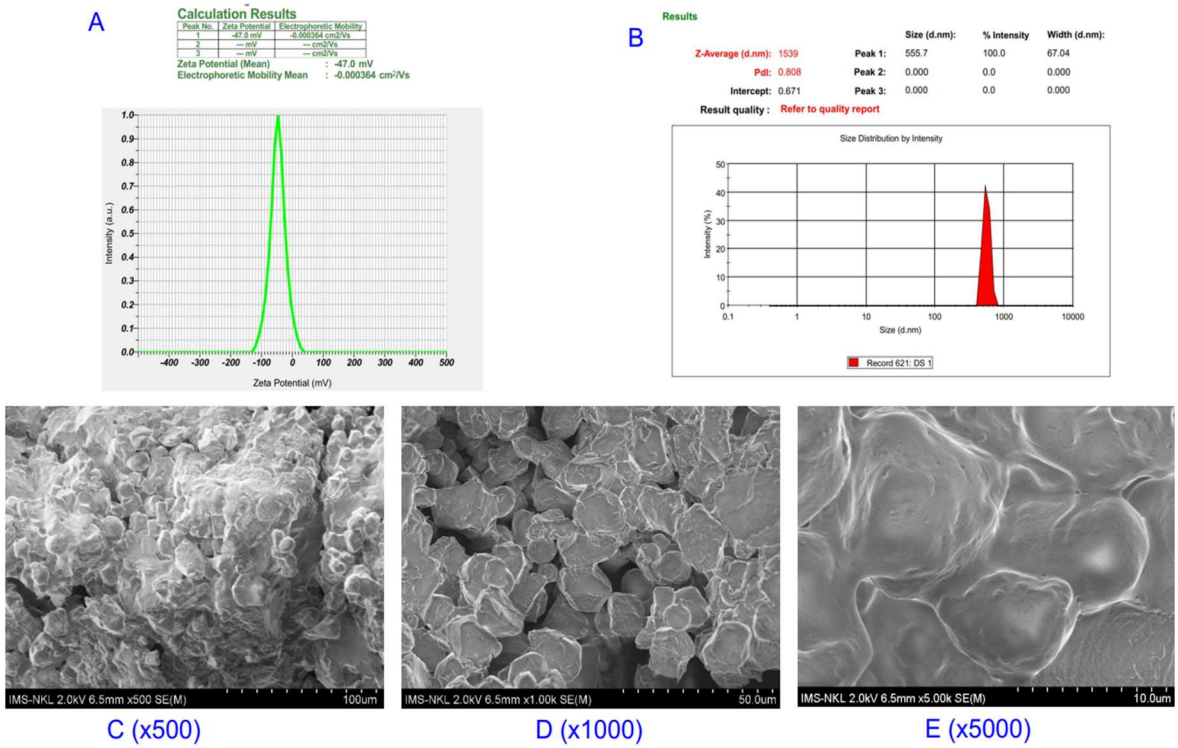
a. Thế zeta, kích thước hạt và cấu trúc bề mặt SEM

Phổ thế zeta (Hình 3.11A) của bột vi bao ĐS cho thấy giá trị ζ = - 47,0 mV, phản ánh hệ hạt có điện tích âm cao và độ bền keo mạnh. Lực đẩy tĩnh điện lớn giữa các hạt giúp ngăn cản hiện tượng kết tụ trong môi trường nước, chứng tỏ hệ vi bao có tính ổn định điện động học tốt. Sự ổn định này một phần đến từ sự hiện diện của nhóm $–COO^–$ và –OH trong GA [180], PEC và MCS [161], tạo nên bề mặt tích điện âm rõ rệt. Ngoài ra, silica bổ sung 0,5% có thể làm tăng nhẹ giá trị âm của zeta nhờ khả năng mang điện âm tự nhiên của hạt SiO_2, góp phần duy trì độ phân tán cao của hệ.

Phổ phân bố kích thước hạt cho thấy mẫu bột có Z-average = 1539 nm, với kích thước đỉnh phân bố chính khoảng 555,7 nm và PDI = 0,808. Điều này phản ánh hệ hạt có phân bố kích thước rộng, gồm một nhóm hạt nhỏ (0,55 μm) chiếm ưu thế và một phần nhỏ các cụm hạt lớn hơn do kết tụ cơ học trong quá trình sấy. Giá trị PDI >0,7 cho thấy mức độ đồng nhất kích thước trung bình [108], song hệ vẫn ổn định động học nhờ giá trị thế zeta âm cao (- 47 mV).

Ảnh hiển vi điện tử quét (Hình 3.11C-E) cho thấy các hạt có hình cầu không hoàn toàn, bề mặt nhăn nhẹ. Ở độ phóng đại 1.000 lần cho thấy các hạt bột có hình thái khối đa diện kích thước micromet, bề mặt thô ráp, nhiều nếp nhăn kéo dài theo phương co rút, cho thấy quá trình hình thành lớp màng xảy ra không đồng nhất trong quá trình sấy. Nhiều hạt có rìa cạnh uốn gấp hoặc gãy cục bộ, chứng tỏ lớp màng có độ đàn hồi thấp, bị đóng rắn nhanh thay vì tạo cấu trúc tròn/láng. Ở độ phóng đại 5.000 lần, lớp màng bao không đồng nhất về độ dày, các vùng phồng – lõm xen kẽ. Các nếp nhăn này hình thành do co rút không đồng đều khi nước bốc hơi dưới điều kiện chân không (30-40 °C, 73 cmHg), đặc biệt ở mẫu có hàm lượng MD cao dễ tạo màng giòn hơn khi khử ẩm. Tuy nhiên, silica (0,5%) hoạt động như chất chống dính và hấp phụ ẩm. Khi nước bốc hơi trong quá trình sấy, lớp silica này bị "cố định" trên bề mặt màng, tạo thành một lớp hạt mịn phủ ngoài, giúp hạn chế co rút màng và nứt gãy cấu trúc, giúp hạt giữ hình dạng cầu đều hơn.

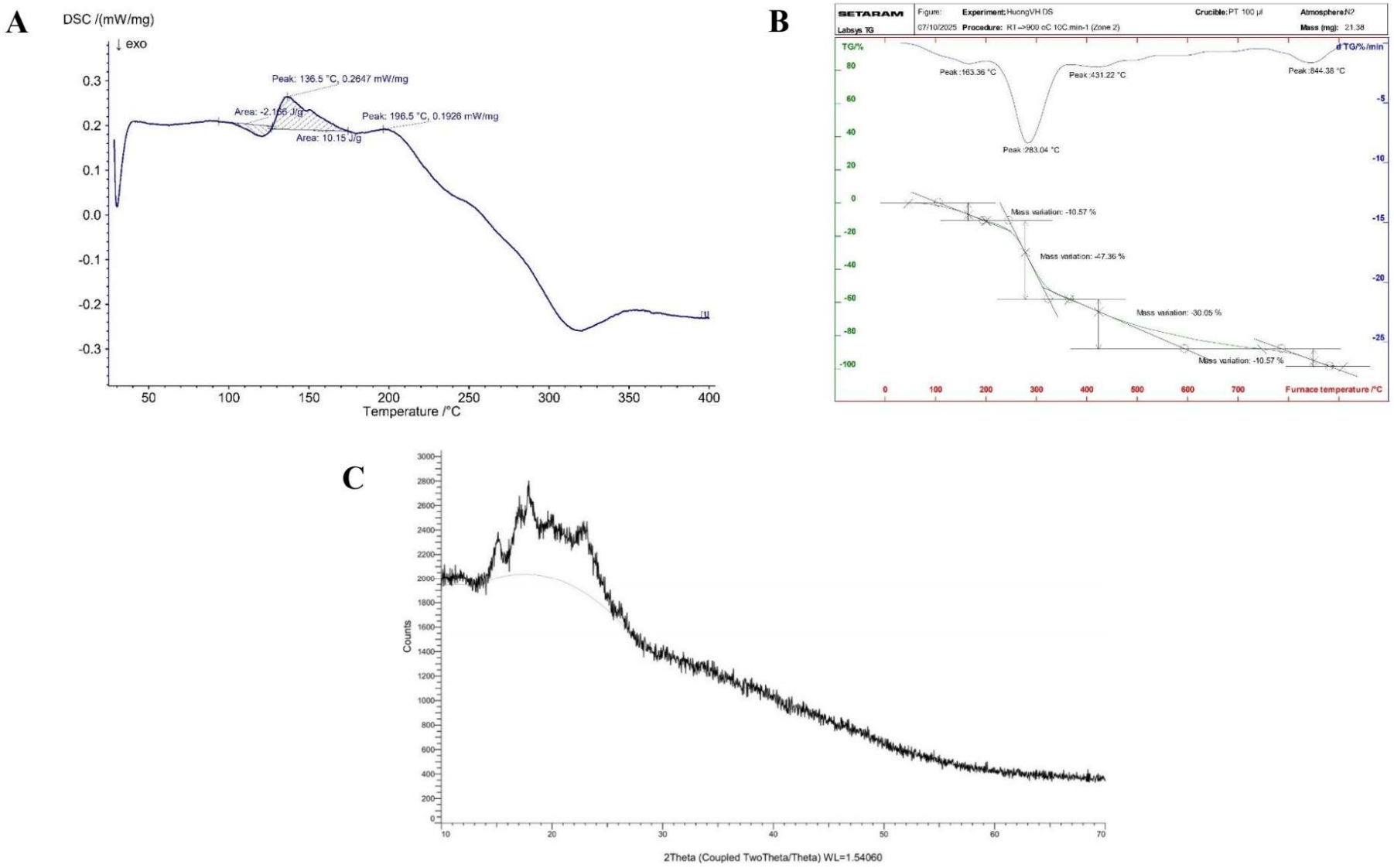
Nhìn chung, kết quả từ ba phép phân tích (thế zeta, DLS, SEM) cho thấy công thức MD/GA/MCS/PEC = 5/1/3/1 tạo ra bột vi bao có độ bền keo cao, kích thước hạt trung bình lớn và cấu trúc bề mặt nhăn nhẹ, thể hiện tính ổn định tốt nhưng kém linh hoạt hình thái.



Hình 3. 11. Phổ thế zeta (A), phân bố kích thước hạt (B) và ảnh SEM (C, D, E) của bột vi bao ĐS

b. Phổ DSC, TGA và XRD của bột vi bao ĐS

Phổ DSC của bột vi bao ĐS (Hình 3.12A) thể hiện hai đỉnh chuyển pha đặc trưng tại 136,5 °C và 196,5 °C, phản ánh các quá trình biến đổi nhiệt của hệ vật liệu trong quá trình gia nhiệt từ 30-400 °C. Cụ thể, đỉnh thu nhiệt tại 136,5 °C tương ứng với sự bốc hơi ẩm hấp phụ hoặc sự chuyển pha thủy tinh (Tg) của mạng chất mang gồm MD, GA, MCS và PEC [109]. Đáng chú ý, không xuất hiện đỉnh nóng chảy đặc trưng của hoạt chất tự do trong vùng 100-150 °C, chứng tỏ hoạt chất của ĐS đã được phân tán đồng nhất trong nền vô định hình, không còn tồn tại dạng tinh thể tự do. Tiếp theo, đỉnh tỏa nhiệt tại 196,5 °C (diện tích 10,15 J/g) phản ánh quá trình tái sắp xếp và bán kết tinh cục bộ của mạng polymer, cũng như sự hình thành tương tác bền giữa hoạt chất của ĐS và chất bao màng. Từ sau 200 °C trở đi, đường cong DSC biểu hiện một xu hướng giảm dần kéo dài, đặc trưng cho quá trình phân hủy nhiệt của hệ vật liệu. Đa số các hoạt chất cũng như các polymer bao màng thường bắt đầu phân hủy từ 220-260 °C [243]. Đồng thời, sự ổn định nhiệt tới 200 °C là điều kiện thuận lợi cho quá trình bảo quản và ứng dụng sản phẩm dưới điều kiện khô, không yêu cầu bảo quản lạnh.



Hình 3. 12. Phổ DSC (A), TGA (B) và XRD (C) của bột vi bao ĐS

Phổ TGA của bột vi bao ĐS (Hình 3.12B) cho thấy mẫu đã trải qua bốn giai đoạn mất khối lượng. Giai đoạn đầu (50-200 °C) mẫu mất khoảng 10,57% chủ yếu liên quan đến sự bay hơi của nước hấp phụ và nước liên kết yếu. Giai đoạn hai (200-350 °C) với đỉnh tại 283 °C có mức mất khối lượng lớn nhất (47,36%) phản ánh quá trình phân hủy nhiệt chính các thành phần hữu cơ trong bột vi bao, gồm các polysaccharide của hệ chất bao (MD, GA, MCS, PEC) và chất rắn trong dịch chiết ĐS. Giai đoạn ba (350-600 °C) có đỉnh tại 431 °C, mẫu tiếp tục mất thêm 30,05%, có thể liên quan đến sự phân hủy tiếp theo của các cấu tử hữu cơ và phần vật chất đã bị biến đổi nhiệt. Giai đoạn 4 (trên 600 °C) khối lượng giảm nhẹ 10,57% do phần cặn nhiệt tiếp tục phân hủy trong môi trường nitơ. Tổng khối lượng mất đạt 98,55%, chứng tỏ mẫu phân hủy gần hoàn toàn. Nhiệt độ phân hủy chính khoảng 283°C, cao hơn nhiều so với nhiệt độ bảo quản thông thường, cho thấy toàn bộ hệ bột vi bao Đan sâm, gồm dịch chiết và hệ chất bao MD–GA–MCS–PEC, có độ bền nhiệt tốt trong điều kiện bảo quản dự kiến.

Phổ XRD của bột vi bao ĐS (Hình 3.12C) thể hiện một vùng nhiễu xạ rộng trong khoảng 2θ = 14-25°, với cường độ cao nhất ở khoảng 17-19° và một số cực đại cục bộ. Việc không xuất hiện hệ đỉnh nhiễu xạ sắc nét, tách biệt rõ cho thấy bột vi bao thành phẩm chủ yếu mang đặc trưng vô định hình hoặc có độ kết tinh thấp. Kết quả này gợi ý rằng các thành phần, bao gồm các hợp chất hoạt tính, có thể đã được phân tán trong nền chất bao và không hình thành pha tinh thể riêng biệt trong giới hạn phát hiện của phép đo XRD. Ngoài ra, vùng nhiễu xạ tại 2θ ≈ 21-24° có thể liên quan đến silica vô định hình (SiO_2) được bổ sung ở tỉ lệ 0,5% nhằm hạn chế hiện tượng dính bám và chống vón cho bột vi bao, do vùng nhiễu xạ này phù hợp với các công bố trước đây về đặc trưng XRD của SiO_2 vô định hình [230]. Tuy nhiên, để xác định chính xác nguồn gốc của các vùng nhiễu xạ và sự thay đổi trạng thái rắn sau vi bao, cần phân tích bổ sung dịch chiết cô đặc ĐS, hỗn hợp chất bao MD–GA–MCS–PEC, SiO_2 và bột vi bao thành phẩm trong cùng điều kiện đo.

3.3.1.4. Kết quả phân tích một số hoạt chất, kiểm nghiệm vi sinh vật, kim loại nặng và đánh giá khả năng kháng vi sinh vật và ức chế tế bào ung thư in vitro của bột vi bao ĐS

a. Kết quả kiểm tra hàm lượng hoạt chất

Kết quả Bảng 3.20 cho thấy hoạt chất Cryptotanshinone và Tanshinone I được bảo toàn sau quá trình vi bao và sấy chân không. Đây là yếu tố quan trọng vì các hoạt chất

này nhạy cảm với nhiệt, ánh sáng và oxy, dễ bị oxy hóa hoặc phân hủy trong môi trường. Điều này chứng tỏ hỗn hợp bao màng đa cấu tử (MD–GA–MCS–PEC) không chỉ duy trì hàm lượng hoạt chất mà còn tạo tiền đề cho sự ổn định lâu dài trong bảo quản và ứng dụng thực phẩm chức năng từ ĐS.

Bảng 3. 20. Hàm lượng hoạt chất trong bột vi bao ĐS

STT	Tên mẫu	Cryptotanshinone (µg/mg)	Tanshinone I (µg/mg)
1	Bột vi bao ĐS	1,081 ± 0,048	3,129 ± 0,057

b. Kết quả kiểm tra vi sinh vật

Bảng 3. 21. Kết quả phân tích vi sinh bột vi bao ĐS

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	4,98 x 10^1 CFU/g	TCVN 4884-1:2015
2	*Coliforms*	KPH	TCVN 6848:2007
3	*Escherichia Coli*	KPH	TCVN 7924-2:2008
4	*Staphylococus aureus*	KPH	TCVN 4830:2005
5	Tổng số bào tử nấm men – nấm mốc	0,21 x 10^1 CFU/g	TCVN 8275:2010
6	*Clostridium perfringens*	KPH	TCVN 4991:2005

Kết quả phân tích vi sinh của bột vi bao ĐS (Bảng 3.21) cho thấy chất lượng vi sinh đạt yêu cầu an toàn. Tổng số vi sinh vật hiếu khí đo được 4,98 × 10^1 CFU/g tương đối thấp, cho thấy nguyên liệu và quá trình sản xuất đảm bảo vệ sinh. Các chỉ tiêu chỉ định nguy cơ an toàn thực phẩm đều "KPH" (không phát hiện), chứng tỏ sản phẩm không bị nhiễm chéo phân hay vi khuẩn gây bệnh thường gặp. Tổng số bào tử nấm men - nấm mốc cũng rất thấp, phù hợp với yêu cầu đối với sản phẩm dạng bột khô. Điều này cho thấy quy trình vi bao, sấy và đóng gói đã được kiểm soát tốt độ ẩm và điều kiện vệ sinh. Như vậy, về khía cạnh an toàn vi sinh, bột vi bao ĐS hoàn toàn đạt yêu cầu để tiếp tục ứng dụng trong phát triển sản phẩm tiếp theo.

c. Kết quả kiểm tra kim loại nặng

Kết quả kiểm tra kim loại nặng của bột vi bao ĐS (Bảng 3.22) cho thấy các chỉ tiêu chính gồm chì (Pb), thủy ngân (Hg), cadimi (Cd) và asen (As) đều "KPH" (không phát hiện) với giới hạn phát hiện thấp (LOD từ 0,001-0,01 ppm). Điều này chứng tỏ nguyên liệu và các chất bao sử dụng trong công thức không bị ô nhiễm kim loại nặng,

quá trình sản xuất – sấy – đóng gói được thực hiện trong điều kiện sạch, hạn chế tiếp xúc với nguồn nhiễm từ thiết bị hoặc môi trường.

Bảng 3. 22. Kết quả phân tích kim loại nặng của bột vi bao ĐS

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Hàm lượng chì (Pb)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 8126 – 1:2009
2	Hàm lượng thủy ngân (Hg)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 7604:2007
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 7603:2007
4	Hàm lượng Asen (As)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 9521:2012

d. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi sinh vật

Bảng 3. 23. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao ĐS

Nồng độ (mg/mL)	Đường kính vòng ức chế (mm)				
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella spp.*	*Bacillus anthracis*	*Candida albicans*
70	-	-	-	24;24;24	23;23;23
50	21;21;21	22;22;22,5	23;23,5;23,	18;18;19	17,5;17,5;18
30	19;18,5;19	18;18;18	17;16,5;17	15;14;14,5	12,5;13;13
10	11;11;11	12;11;12	14;14;14	-	-
Chứng dương	29;29;29	29;30;29,5	29;28;29	30;30;30	29;28,5;28,5

Dựa trên kết quả khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật, bột vi bao ĐS (hệ hoạt chất phức hợp giàu polyphenol và diterpenoid) cho thấy tác dụng ức chế vi sinh vật rõ rệt trên cả vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm men gây bệnh. Ở nồng độ 70 mg/mL, đường kính vòng ức chế đạt từ 23-24 mm (tùy chủng), khi ở nồng độ 10 mg/mL vẫn duy trì vùng ức chế trên 11-14 mm, chứng tỏ hoạt chất trong bột vi bao có khả năng ức chế mạnh từ nồng độ cao đến thấp (Bảng 3.23 và Phụ lục 4.1).

Kết quả Bảng 3.24 cho thấy bột vi bao Đan sâm có khả năng ức chế các vi sinh vật khảo sát với MIC trong khoảng 10–27,5 mg/mL, trong đó *Salmonella* nhạy cảm nhất với MIC 10 mg/mL, tiếp theo là *S. aureus* và *E. coli* với MIC 12,5 mg/mL.

Bảng 3. 24. Kết quả xác định MIC của bột vi bao ĐS

Vi sinh vật	MIC (mg/mL)
Staphylococcus aureus	12,5
Escherichia coli	12,5
Salmonella	10
Bacillus anthracis	25
Candida albicans	27,5

MIC được công bố đối với các sản phẩm vi bao chứa cao chiết tự nhiên có thể dao động đáng kể tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu, thành phần cao chiết, vật liệu bao, chủng vi sinh vật và phương pháp thử. Chẳng hạn, Radünz et al. [203] ghi nhận cao chiết *Beta vulgaris* vi bao bằng zein thể hiện tác dụng ức chế và diệt *Salmonella Typhimurium* ở nồng độ 200 mg/mL. Do đó, kết quả này chỉ được sử dụng để tham khảo, không phải là cơ sở để so sánh trực tiếp mức độ hoạt tính. Nhìn chung, các giá trị MIC của bột vi bao ĐS thu được còn khá cao. Vì vậy, kết quả này chỉ mang ý nghĩa sàng lọc ban đầu. Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của vật liệu bao, khả năng giải phóng hoạt chất và so sánh với cao chiết tự do để đánh giá đầy đủ hơn hoạt tính kháng vi sinh vật và tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

e. Kiểm tra đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro*

Kết quả ở Bảng 3.25 cho thấy bột vi bao ĐS thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* trên hầu hết các dòng tế bào ung thư khảo sát. Ở nồng độ sàng lọc 100 µg/mL, sự tăng trưởng của các dòng tế bào ung thư vú bị ức chế ở mức rất cao. Tuy nhiên, mức độ ức chế trên dòng tế bào ung thư tụy BxPC3 chỉ đạt 68±2%, thấp hơn đáng kể so với các dòng ung thư vú, phản ánh sự khác biệt về độ nhạy giữa các loại tế bào đối với mẫu thử.

Giá trị GI_{50} của mẫu dao động trong khoảng 14,7–44 µg/mL trên các dòng tế bào ung thư vú, cho thấy hiệu lực ức chế tăng sinh ở mức trung bình. Trong đó, mẫu thể hiện hoạt tính tốt hơn trên các dòng SKBR3 (HER2 dương tính) và T47D (ER dương tính), với GI_{50} lần lượt là 14,7±2,0 và 16,5±1,8 µg/mL. Ngược lại, hoạt tính trên các dòng thể ba âm tính như MDAMB231 và MDAMB468 thấp hơn đáng kể ($GI_{50} \approx 44$ µg/mL), cho thấy mẫu kém hiệu quả hơn trên nhóm tế bào có tính xâm lấn cao và khó điều trị.

Bảng 3. 25. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* của bột vi bao ĐS

Dòng tế bào ung thư (loại tế bào)	% ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ 100 µg/mL	GI_{50} (µg/mL)
MCF-7 (Vú, ER dương tính)	>100	17,2 ± 2,6
MDAMB231 (Vú, TNBC)	>100	44 ± 6,8
T47D (Vú, ER dương tính)	>100	16,5 ± 1,8
ZR-75-1 (Vú, ER dương tính)	>100	23 ± 6,6
SKBR3 (Vú, HER2 dương tính)	>100	14,7 ± 2,0
BT474 (Vú, HER2 dương tính)	>100	36 ± 0,3
BT20 (Vú, ER âm tính)	>100	25 ± 6,1
MDAMB468 (Vú, TNBC)	>100	44 ± 3,2
MCF10A (Vú bình thường)	97 ± 1	36 ± 2,1
BxPC3 (Tuyến tụy)	68 ± 2	74 ± 2,2

TNBC: Ung thư vú âm tính thể ba, ER Pos/Neg: Dương tính/Âm tính với thụ thể Estrogen, HER2 Pos: Dương tính với thụ thể HER2. Giá trị % ức chế tăng trưởng càng cao thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của tế bào càng lớn. Giá trị >100 cho thấy sự tăng trưởng của tế bào đã bị ức chế hoàn toàn, bao gồm cả việc gây chết tế bào. GI_{50} là nồng độ ức chế 50% sự tăng trưởng của tế bào (giá trị này càng thấp thì khả năng ức chế tăng trưởng càng mạnh).

Đáng chú ý, giá trị GI_{50} trên dòng tế bào bình thường MCF10A (36±2,1 µg/mL) tương đương với một số dòng tế bào ung thư, cho thấy tính chọn lọc của mẫu chưa rõ rệt. Điều này cho thấy mặc dù bột vi bao ĐS có khả năng ức chế tăng sinh tế bào, nhưng mức độ phân biệt giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường còn hạn chế.

Kết quả trên phản ánh đúng đặc tính dược học vốn có của ĐS: dịch chiết toàn phần giàu các polyphenol và acid phenolic (vốn nổi trội về tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tế bào và điều hòa viêm), nhưng hàm lượng các hoạt chất diterpenoid (tanshinone và cryptotanshinone) mới là tác nhân gây apoptosis mạnh trên tế bào ung thư khá thấp. Do đó, khi chiết xuất ở dạng toàn phần và chưa tinh sạch phân đoạn lipid, hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* bị "pha loãng", chủ yếu dừng ở mức tác dụng sinh học điều hòa nhẹ thay vì gây độc trực tiếp lên tế bào ác tính. Điều này giải thích tại sao bột vi bao ĐS gây ức chế đáng kể tế bào bình thường nhưng không đạt hiệu lực chọn lọc trên tế bào

ung thư, đồng thời cũng lý giải ĐS phù hợp hơn với các hướng ứng dụng chống oxy hóa – bảo vệ nội mô – cải thiện tuần hoàn hơn là chống ung thư trực tiếp.

So sánh với các nghiên cứu đã công bố về hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* của dịch chiết thực vật, giá trị GI_{50} của bột vi bao ĐS trong nghiên cứu này nằm trong khoảng tương đương hoặc thấp hơn so với nhiều dịch chiết thô giàu polyphenol và saponin như *Catharanthus roseus* [262], *Helicteres hirsuta* [198], *Paramignya trimera* [173].

Nhìn chung, bột vi bao ĐS thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ở mức trung bình, với hiệu quả phụ thuộc vào loại tế bào. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của mẫu trong nghiên cứu các tác nhân sinh học có nguồn gốc tự nhiên. Tuy nhiên, cần tiếp tục tối ưu hóa hệ vi bao và tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác động cũng như đánh giá *in vivo* để nâng cao hiệu quả và tính chọn lọc.

3.3.2. Kết quả phân tích bột vi bao thân rễ BLMH

3.3.2.1. Kết quả phân tích tính chất hóa lý của bột vi bao BLMH

Kết quả tại Bảng 3.26 cho thấy tỷ lệ giữa dịch cô và hỗn hợp bao màng, cũng như thành phần chất mang có ảnh hưởng rõ rệt đến các tính chất lý hóa của bột vi bao. Trong số các công thức khảo sát, mẫu số 9 (40/60; MD/GA/MCS/PEC = 3/1/5/1) thể hiện độ ẩm cao nhất (7,51%) và hoạt độ nước 0,517. Do hàm lượng MD thấp và MCS cao, hệ bao có xu hướng giữ nước mạnh hơn vì MCS chứa nhiều nhóm hydroxyl có khả năng hình thành liên kết hydro với nước, làm chậm quá trình thoát ẩm trong giai đoạn sấy phun. Cơ chế này phù hợp với nhận định của Fang và Bhandari (2010) [78] khi MD ít hút ẩm hơn MCS, nên khi giảm MD so với MCS thì tính hút ẩm sẽ tăng. Đồng thời, Ribeiro và cộng sự [207] cũng chứng minh rằng tăng hàm lượng tinh bột trong hệ bao làm tăng nước liên kết và kéo theo độ ẩm sản phẩm cao hơn. Tuy nhiên, hoạt độ nước của các mẫu đều < 0,6, do đó vẫn thuộc vùng ổn định và an toàn trong bảo quản bột khô.

Bảng 3. 26. Kết quả phân tích các tính chất của bột vi bao BLMH

TT	Tỷ lệ dịch cô/hỗn hợp bao màng	Tỷ lệ MD/GA/ MCS/PEC	Độ ẩm (%)	Hoạt độ nước (a_w)	Độ hòa tan (%)	Năng suất bao màng (%)	TSC (mg EE/ g DM)	TPC (mg GAE/ g DM)	FRAP (mg TE/ g DM)
1	60/40	4/1/4/1	6,11±1,23^{ab}	0,446±0,004^{f}	41,57±0,55^{bc}	74,61±0,68^{d}	149,23±3,83^{bcd}	3,33±0,40^{cd}	4,45±0,65^{c}
2		5/1/3/1	6,78±2,08^{ab}	0,498±0,004^{d}	38,70±8,49^{c}	78,86±1,53^{c}	138,18±18,02^{cde}	3,23±0,96^{cd}	6,98±0,93^{a}
3		3/1/5/1	**7,45±0,09^{a}**	0,493±0,003^{d}	44,06±1,20^{abc}	79,42±0,72^{bc}	147,01±2,55^{bcd}	3,21±0,13^{cd}	**7,61±0,86^{b}**
4	50/50	4/1/4/1	6,60±0,54^{ab}	0,500±0,003^{c}	42,60±2,28^{abc}	71,78±0,60^{e}	143,21±15,6^{c}	3,04±0,05^{de}	4,56±0,47^{c}
5		5/1/3/1	4,53±0,36^{c}	0,509±0,003^{c}	46,71±4,78^{abc}	75,13±0,010^{d}	140,72±2,48^{bcde}	2,63±0,15^{ef}	4,65±0,10^{c}
6		3/1/5/1	6,64±2,18^{ab}	0,504±0,003^{c}	47,00±5,03^{ab}	81,45±0,009^{ab}	123,11±20,91^{e}	3,80±0,15^{b}	4,81±0,76^{c}
7	40/60	4/1/4/1	5,70±1,02^{bc}	0,56±0,012^{a}	43,02±1,19^{abc}	75,87±0,006^{d}	153,73±7,72^{bc}	3,25±0,40^{cd}	4,58±0,17^{c}
8		5/1/3/1	6,97±0,02^{ab}	0,464±0,002^{e}	**50,96±6,90^{a}**	80,93±0,008^{abc}	132,45±9,51^{de}	2,28±0,26^{f}	4,24±0,50^{c}
9		**3/1/5/1**	**7,51±0,35^{a}**	**0,517±0,002^{b}**	**43,47±2,25^{abc}**	**81,86±0,012^{a}**	**158,90±8,08^{bc}**	**3,52±0,14^{bc}**	**7,30±0,96^{c}**
10	Không bao màng	0	6,52±0,07^{ab}	0,491±0,004^{d}	43,56±3,63^{abc}	ND	207,69±1,14^{a}	5,19±0,06^{a}	8,05±0,06^{a}

Kết quả thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể ($p<0,05$); TSC: hàm lượng saponins tổng số; TPC: hàm lượng phenolics tổng số; EE: tương đương với escin; GAE: tương đương với gallic acid; TE: tương đương với trolox; Mẫu 0: mẫu đối chứng (không thực hiện bao màng)

Mẫu 9 có độ hòa tan ở mức trung bình (43,47%), khác biệt không đáng kể với mẫu đối chứng không bao (43,56%) nhưng thấp hơn đáng kể so với mẫu 8 (50,96%) – công thức có hàm lượng MD cao hơn. Kết quả này khẳng định vai trò then chốt của MD trong việc thúc đẩy quá trình tái hydrat hóa nhờ đặc tính hòa tan nhanh và khả năng tạo dựng cấu trúc bề mặt khô xốp, giúp tối ưu hóa diện tích tiếp xúc với dung môi. Ngược lại, sự gia tăng tỷ lệ MCS với cấu trúc polyme mạch nhánh và mật độ liên kết hydro nội phân tử cao đã hình thành một ma trận màng bao có độ bền liên kết lớn, làm gia tăng trở lực khuếch tán và hạn chế tốc độ hòa tan ban đầu. Phân tích này tương đồng với nhận định của Ribeiro và cộng sự (2020) [207], khi cho rằng nồng độ các polyme mạch dài tăng cao sẽ tạo nên hệ thành vách dày đặc, ít tan hơn so với các tinh bột thủy phân như MD. Bên cạnh đó, mặc dù GA đóng vai trò là tác nhân nhũ hóa và ổn định hệ keo, hỗ trợ khả năng phân tán hạt trong môi trường nước [42], nhưng không đủ để bù lại sự suy giảm độ hòa tan do hàm lượng MCS cao.

Năng suất bao màng dao động trong khoảng 71,78–81,86%, tùy thuộc vào tỷ lệ dịch cô/chất bao và thành phần hệ chất mang. Nhìn chung, các mẫu có tỷ lệ chất bao cao hơn (40/60) cho năng suất bao màng cao hơn so với các tỷ lệ thấp hơn, cho thấy vai trò quan trọng của chất mang trong việc hạn chế tổn thất vật liệu trong quá trình sấy. Trong đó, mẫu 9 (công thức 40/60–3/1/5/1) đạt năng suất bao màng cao nhất (81,86%), cho thấy sự phối hợp giữa các chất mang ở tỷ lệ này có khả năng hình thành lớp bao tương đối ổn định, giúp giảm hiện tượng dính bám và thất thoát trong quá trình sấy.

Tóm lại, nhóm tỷ lệ 40/60 có hiệu quả bao phủ tốt đối với dịch chiết thân rễ BLMH xét về các tính chất hóa lý

3.3.2.2. Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa của bột vi bao BLMH

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn dịch cô quay/hỗn hợp chất bao màng cũng như thành phần các chất trong hỗn hợp bao màng đến hàm lượng hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa của bột vi bao BLMH được trình bày trong Bảng 3.26.

Nhìn chung, mẫu đối chứng (100/0) có TSC, TPC và FRAP cao nhất do không bị pha loãng bởi vật liệu bao màng.

Ở nhóm tỷ lệ 60/40, mẫu có tỷ lệ chất bao 3/1/5/1 cho giá trị FRAP cao nhất (7,61 mg TE/g DM), cho thấy khả năng khử sắt của hệ vẫn được duy trì tương đối tốt sau sấy.

Tuy nhiên, TSC và TPC chưa đạt mức cao, cho thấy hiệu quả bảo lưu hoạt chất chưa tối ưu. Nguyên nhân có thể là do ở tỷ lệ này, lượng dịch cô còn chiếm ưu thế, trong khi lượng chất bao chưa đủ để hình thành mạng lưới polymer liên tục và bền vững quanh các cấu tử hoạt tính. Khi đó, một phần saponin và phenolic chỉ được giữ lại lỏng lẻo trong ma trận hoặc phân bố gần bề mặt hạt, làm tăng khả năng tiếp xúc trực tiếp với nhiệt và oxy trong quá trình sấy. Đồng thời, sự thoát ẩm nhanh ở hệ có hàm lượng lõi cao có thể làm cấu trúc hạt kém đồng nhất hơn, tạo ra các khoảng rỗng hoặc vi khe nứt, từ đó làm tăng thất thoát hoạt chất.

Ở tỷ lệ 50/50, TSC và TPC có xu hướng giảm so với nhóm 60/40 do mức độ pha loãng hoạt chất lớn hơn. Mặc dù lượng chất bao tăng lên giúp lớp màng hình thành ổn định hơn và cải thiện khả năng bảo vệ, nhưng hiệu quả này vẫn chưa thật sự thể hiện rõ, nên FRAP chỉ đạt mức trung bình. Kết quả này cho thấy việc tăng lượng chất bao không tự động làm tăng khả năng bảo lưu hoạt chất, mà cần có sự cân bằng phù hợp giữa tỷ lệ lõi/vỏ và cấu trúc mạng lưới polymer hình thành trong quá trình sấy. Nếu lớp màng dày hơn nhưng phân bố hoạt chất trong ma trận chưa hợp lý, hoặc các tương tác giữa hoạt chất và chất bao chưa đủ mạnh, thì hiệu quả bảo vệ vẫn bị hạn chế.

Ở nhóm tỷ lệ 40/60, mẫu 3/1/5/1 đạt TSC và TPC cao nhất, đồng thời FRAP cũng duy trì ở mức tương đối cao (7,30 mg TE/g DM). Kết quả này cho thấy khi pha bao chiếm ưu thế, hệ vi bao có điều kiện hình thành mạng lưới polymer đầy đủ, đặc và bền cơ học hơn. Xét về cơ chế vi bao, hiệu quả bảo lưu hoạt chất ở tỷ lệ này có thể được giải thích thông qua sự phối hợp của nhiều tương tác trong hệ [58]. Trước hết, các hợp chất sinh học được giữ lại về mặt cơ học trong ma trận polymer dày và liên tục, làm giảm sự khuếch tán ra bề mặt trong quá trình thoát ẩm. Đồng thời, liên kết hydro và tương tác tĩnh điện giữa PEC, GA và các hợp chất phenolic góp phần ổn định các cấu tử phân cực trong hệ. Đối với BLMH, các saponin steroid mặc dù có tính phân cực nhất định nhưng vẫn chứa các phần aglycone kỵ nước, do đó có thể tương tác với các vùng kỵ nước của GA và MCS, giúp tăng khả năng neo giữ trong ma trận. Ngoài ra, một phần hoạt chất có thể được giữ dưới dạng phức hợp bao hàm hoặc liên kết yếu trong cấu trúc xoắn của MCS, góp phần hạn chế sự tiếp xúc trực tiếp với oxy và nhiệt trong quá trình sấy. Bên cạnh đó, hàm lượng MCS cao góp phần gia cố cấu trúc thành vách, làm giảm độ rỗng và hạn chế biến dạng hạt trong quá trình sấy [207]. Nhờ sự kết hợp của các cơ chế này,

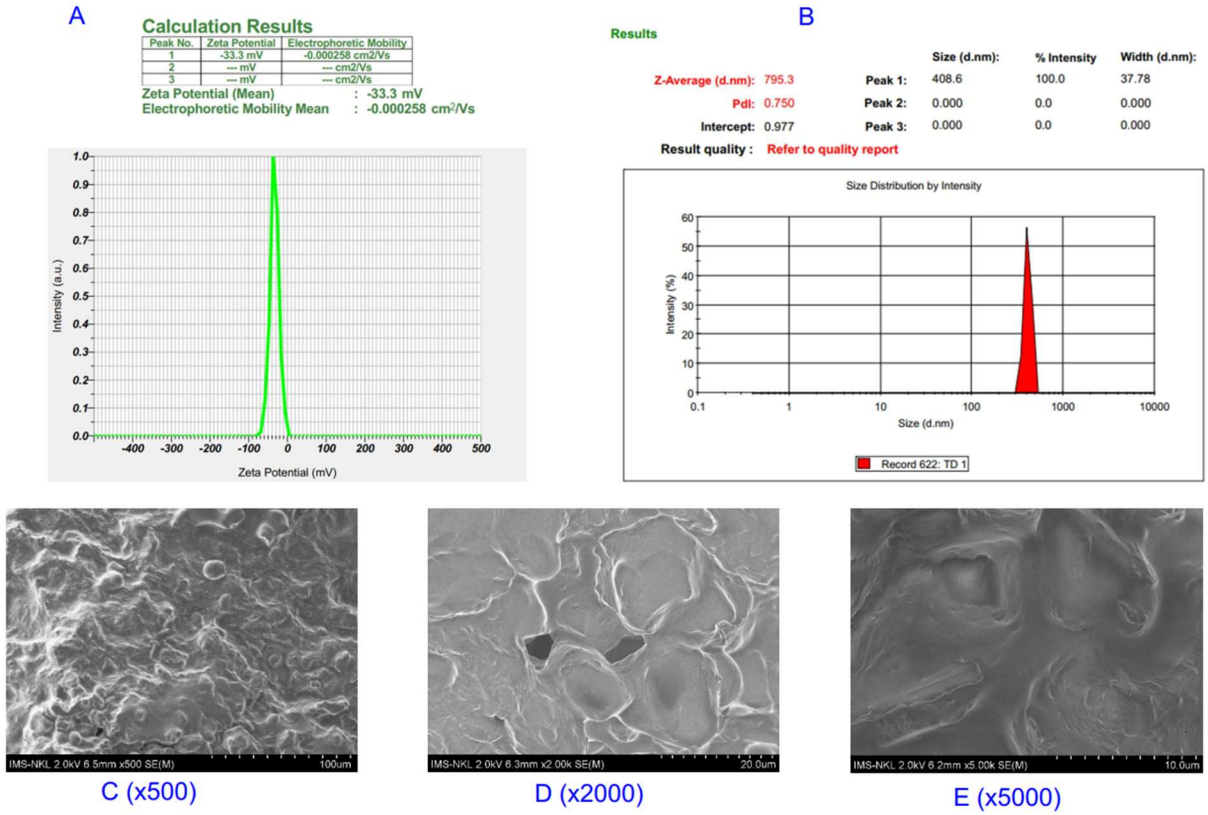
hệ vi bao ở tỷ lệ 40/60 không chỉ ổn định về cấu trúc mà còn hiệu quả trong việc bảo vệ và duy trì hoạt tính sinh học của các hợp chất trong dịch chiết BLMH.

Từ các kết quả thu được, nhìn chung, mẫu 9 (40/60, 3/1/5/1) không chỉ đạt các chỉ tiêu hóa lý ở mức ổn định, mà còn cho hiệu quả bảo vệ các hợp chất chống oxy hóa cao nhất trong số các công thức khảo sát, cho thấy đây là tỷ lệ phối trộn phù hợp nhất cho vi bao dịch chiết thân rễ BLMH.

3.3.2.3. Kết quả đo cấu trúc - hình thái

a. Thế zeta, kích thước hạt và hình ảnh SEM

Phổ thế zeta (Hình 3.13A) cho thấy giá trị ζ = - 33,3 mV, phản ánh độ bền keo trung bình của hệ vi bao BLMH. Mặc dù thấp hơn vi bao ĐS, giá trị này vẫn nằm trong khoảng ổn định (|ζ| > 30 mV), cho thấy hệ có khả năng phân tán tốt và ít xảy ra kết tụ trong dung dịch nước. Điện tích âm chủ yếu hình thành từ nhóm –COO^- và –OH trong các polysaccharide (GA, MCS, PEC), đồng thời silica 0,5% góp phần duy trì ζ âm ổn định hơn nhờ bề mặt SiO_2 tích điện âm yếu, tạo lực đẩy tĩnh điện bổ sung giữa các hạt.



Hình 3. 13. Phổ thế zeta (A), phân bố kích thước hạt (B) và ảnh SEM (C, D, E) của bột vi bao BLMH

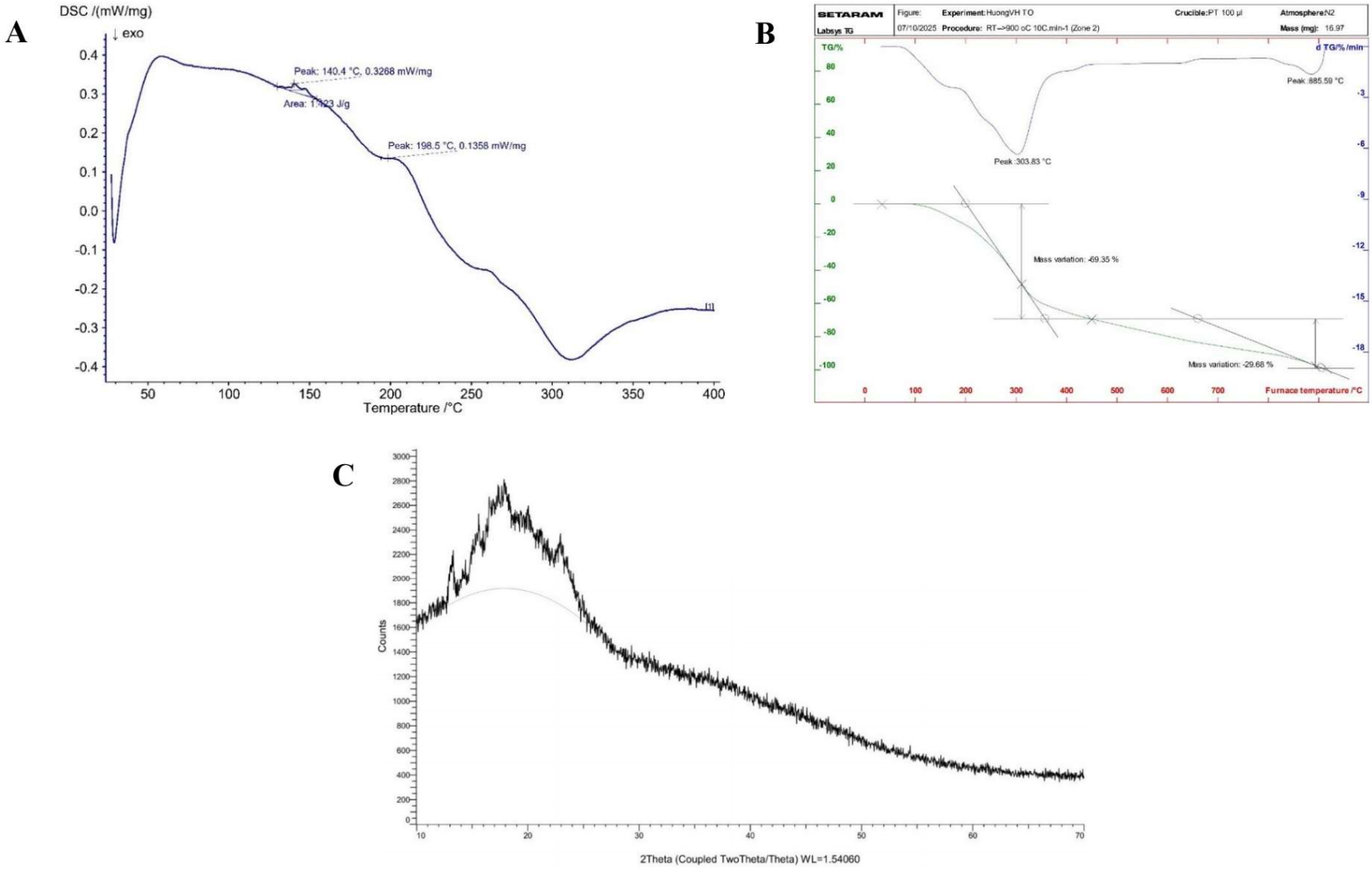
Phổ phân bố kích thước DLS (Hình 3.13B) cho thấy Z-average = 795,3 nm và PDI = 0,750, biểu thị hệ hạt có phân bố kích thước tương đối đồng đều. Kích thước trung bình nhỏ hơn và PDI thấp hơn ĐS cho thấy sự hình thành màng bao diễn ra hiệu quả hơn. Nguyên nhân có thể do công thức vi bao có tỷ lệ MCS cao hơn (3/1/5/1) tạo mạng lưới polymer linh hoạt, giúp giọt phân tán bền hơn trong quá trình đồng hóa và hạn chế hợp nhất hạt khi sấy.

Quan sát ảnh SEM (Hình 3.13C-E) ở các độ phóng đại khác nhau cho thấy hạt có hình cầu tương đối hoàn chỉnh, cấu trúc bề mặt đặc trưng bởi màng bao liên tục, ít nứt gãy và độ đặc khối cao. Khi tăng phóng đại lên 2000 lần, có thể quan sát rõ hơn các đường uốn bề mặt và các lõm nhỏ do hiện tượng thoát ẩm, phản ánh cơ chế co rút mềm thay vì co rút phá vỡ. Ở mức phóng đại 5000 lần, bề mặt hạt trở nên mịn, không xuất hiện các khe nứt sâu hay lỗ mao quản mở, chứng tỏ màng bao có mật độ liên kết polymer cao và độ bền cơ học tốt. Cấu trúc này hàm ý rằng lớp màng có khả năng giảm thất thoát chất hoạt tính, hạn chế oxy hóa và giảm thấm ẩm trong bảo quản. Đồng thời, vật liệu có độ đàn hồi vi mô, giúp giảm nứt gãy trong quá trình xử lý sau sấy.

Nhờ sự kết hợp giữa độ bền cơ học của MCS**,** lực đẩy tĩnh điện từ silica và độ dẻo màng từ pectin, hệ vi bao BLMH thể hiện sự ổn định tổng thể cao hơn về mặt hình thái, dù giá trị ζ thấp hơn. Bột vi bao thu được có cấu trúc mịn, kích thước đồng nhất và độ tơi tốt, thuận lợi cho bảo quản và ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm chức năng.

b. Phổ DSC, TGA và XRD của bột vi bao BLMH

Phổ DSC của bột vi bao BLMH (Hình 3.14A) thể hiện hai đỉnh nhiệt đặc trưng tại 140,4 °C và 198,5 °C, cho thấy các quá trình chuyển pha vật lý và biến đổi cấu trúc của hệ chất mang trong quá trình gia nhiệt từ 30-400 °C. Tương tự như hệ vi bao ĐS, hệ vi bao BLMH có tính ổn định nhiệt tốt đến khoảng 200 °C, không có đỉnh tan chảy tinh thể, khẳng định đặc tính vô định hình, yếu tố quan trọng giúp tăng độ tan của hoạt chất kém hòa tan. Kết quả này hỗ trợ việc ứng dụng hệ vi bao BLMH trong thực phẩm chức năng, dược phẩm dạng khô và bảo quản không cần lạnh.



Hình 3. 14. Phổ DSC (A), TGA (B) và XRD (C) của bột vi bao BLMH

Phổ TGA của bột vi bao BLMH (Hình 3.14B) cho thấy hai giai đoạn phân hủy rõ rệt. Ở giai đoạn đầu (50-350 °C), mẫu mất 69,35% khối lượng với đỉnh mạnh tại 303,8 °C. Sự giảm khối lượng trong giai đoạn này bao gồm quá trình thoát ẩm và phân hủy nhiệt của các thành phần hữu cơ trong bột vi bao, gồm các polysaccharide của hệ chất bao MD–GA–MCS–PEC và chất rắn của dịch chiết Bảy lá một hoa. Giai đoạn hai (350-900 °C) mẫu tiếp tục mất thêm 29,68% khối lượng, tương ứng với đỉnh phụ tại 885,6 °C, phản ánh sự phân hủy tiếp theo của các cấu tử hữu cơ và phần cặn nhiệt trong môi trường nitơ. Tổng mức mất khối lượng đến cuối quá trình phân tích đạt 99,03%, tương ứng với lượng cặn còn lại khoảng 0,97%. So với mẫu ĐS, đỉnh phân hủy chính của mẫu vi bao BLMH dịch lên vùng nhiệt độ cao hơn (303 °C so với 283 °C), chứng tỏ hệ vi bao BLMH có độ bền nhiệt tốt hơn trong điều kiện bảo quản dự kiến.

Phổ XRD của mẫu vi bao BLMH (Hình 3.14C) cho thấy đặc trưng gần tương đồng với mẫu vi bao ĐS, thể hiện vùng nhiễu xạ rộng trong khoảng 2θ =14-25°, với cường độ cao nhất ở khoảng 17–19° và một số cực đại cục bộ. Việc không xuất hiện hệ đỉnh nhiễu xạ sắc nét, tách biệt rõ cho thấy bột vi bao thành phẩm chủ yếu mang đặc trưng vô định hình hoặc có độ kết tinh thấp. Kết quả này gợi ý rằng các thành phần, bao gồm các hợp chất hoạt tính, có thể đã được phân tán trong nền chất bao và không hình thành pha tinh thể riêng biệt trong giới hạn phát hiện của phép đo XRD. Vùng nhiễu xạ tại 2θ ≈ 21–24° có thể liên quan đến silica vô định hình (SiO_2) được bổ sung ở tỷ lệ 0,5%, phù hợp với các công bố trước đây [230]. Tuy nhiên, để xác định chính xác nguồn gốc của các vùng nhiễu xạ và sự thay đổi trạng thái rắn sau vi bao, cần phân tích bổ sung dịch chiết cô đặc BLMH, hỗn hợp chất bao MD–GA–MCS–PEC, SiO_2 và bột vi bao thành phẩm trong cùng điều kiện đo.

3.3.2.4. Kết quả kiểm tra vi sinh vật, kim loại nặng và khả năng kháng vi sinh vật và ức chế tế bào ung thư in vitro của bột vi bao BLMH

a. Kết quả kiểm tra vi sinh vật

Bảng 3.27 cho thấy sản phẩm đảm bảo tính an toàn về mặt vi sinh để sử dụng cho các ứng dụng tiếp theo..

Bảng 3. 27. Kết quả phân tích vi sinh bột vi bao BLMH

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	3,85 x 10^1 CFU/g	TCVN 4884-1:2015
2	*Coliform*	KPH	TCVN 6848:2007
3	*Escherichia Coli*	KPH	TCVN 7924-2:2008
4	*Staphylococus aureus*	KPH	TCVN 4830-2005
5	Tổng số bào tử nấm men – nấm mốc	0,12 x 10^1 CFU/g	TCVN 8275-2010
6	*Clostridium perfringens*	KPH	TCVN 4991-2005

b. Kết quả kiểm tra kim loại nặng

Kết quả phân tích kim loại nặng của bột vi bao BLMH (Bảng 3.28) cho thấy các chỉ tiêu Pb, Hg, Cd và As đều không phát hiện (KPH) trong giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD từ 0,001-0,01 ppm). Điều này chứng tỏ nguyên liệu BLMH và các chất bao đảm bảo độ tinh khiết, không bị nhiễm kim loại nặng trong quá trình canh tác, thu hoạch hoặc chế biến. Mặt khác, kết quả này cũng phản ánh quy trình sản xuất – sấy – đóng gói được thực hiện trong môi trường kiểm soát ô nhiễm tốt, không phát sinh nguy cơ nhiễm chéo từ thiết bị hay bao bì.

Bảng 3. 28. Kết quả kiểm tra kim loại nặng của bột vi bao BLMH

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Hàm lượng chì (Pb)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 8126 – 1:2009
2	Hàm lượng thủy ngân (Hg)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 7604:2007
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 7603:2007
4	Hàm lượng Asen (As)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 9521:2012

c. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi sinh vật

Kết quả xác định đường kính vòng ức chế của bột vi bao BLMH được trình bày tại Bảng 3.29 và Phụ lục 6.2. Ở nồng độ 50 mg/mL, đường kính vòng ức chế đối với *E. coli*, *S. aureus* và *Salmonella* spp. dao động từ 24 đến 26 mm, trong khi đối với *B. anthracis* và *C. albicans*, giá trị này nằm trong khoảng 22–22,5 mm. Khi nồng độ bột vi bao giảm xuống 10 mg/mL, đường kính vòng ức chế giảm còn khoảng 15–18 mm. Kết

quả cho thấy khả năng ức chế vi sinh vật của bột vi bao BLMH thay đổi theo nồng độ sử dụng và loại vi sinh vật khảo sát.

Bảng 3. 29. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao BLMH

Nồng độ mẫu (mg/mL)	Đường kính vòng ức chế (mm)				
	Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella spp.*	*Bacillus anthracis*	*Candida albicans*
70	-	-	-	24;24;24	25;25;25
50	24;24;24,5	25;25;25	26;26;26	22;22;22	22,5;22,5;22,5
30	22;21,5;21,5	23;23;23	21;21;21	13,5;14;14	16;16;16
10	18;18;18	18;17,5;18	15;15;15	-	-
Chứng dương	30;30;30	31;31;30,5	31;31;31	28;28;28	30;30;30

Kết quả xác định MIC tại Bảng 3.30 cho thấy bột vi bao BLMH ức chế *S. aureus*, *E. coli* và *Salmonella* ở nồng độ 10 mg/mL. MIC đối với *C. albicans* và *B. anthracis* lần lượt là 22,5 và 25 mg/mL. Như vậy, trong phạm vi các chủng được khảo sát, *S. aureus*, *E. coli* và *Salmonella* nhạy cảm với bột vi bao BLMH hơn *C. albicans* và *B. anthracis*.

Bảng 3. 30. Kết quả xác định MIC của bột vi bao BLMH

Vi sinh vật	MIC (mg/mL)
Staphylococcus aureus	10
Escherichia coli	10
Salmonella	10
Bacillus anthracis	25
Candida albicans	22,5

So với bột vi bao ĐS (Bảng 3.24), bột vi bao BLMH có MIC thấp hơn đối với *S. aureus* và *E. coli* (10 mg/mL so với 12,5 mg/mL) và *C. albicans* (22,5 mg/mL so với 27,5 mg/mL). Đối với *Salmonella* và *B. anthracis*, hai loại bột vi bao có MIC tương đương nhau, lần lượt là 10 và 25 mg/mL. Kết quả này cho thấy bột vi bao BLMH có khả năng ức chế tốt hơn bột vi bao ĐS đối với một số vi sinh vật khảo sát, nhưng không thể hiện sự khác biệt về phổ tác dụng do cả hai sản phẩm đều ức chế được năm vi sinh vật được thử nghiệm.

Hoạt tính kháng vi sinh vật của sản phẩm vi bao chứa cao chiết tự nhiên được công bố có sự khác biệt đáng kể, phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu, thành phần cao chiết, vật liệu bao, công thức vi bao, chủng vi sinh vật và phương pháp thử. Radünz và cộng sự [203] ghi nhận cao chiết *Beta vulgaris* vi bao bằng zein theo phương pháp

electrospraying thể hiện tác dụng ức chế và diệt *Salmonella Typhimurium* ở nồng độ 200 mg/mL. Trong khi đó, Utami và cộng sự [249] cho thấy sự thay đổi công thức vi bao cao chiết *Holothuria atra* bằng chitosan–TPP ảnh hưởng rõ rệt đến đường kính vòng ức chế *S. aureus* và *E. coli*. Do đó, các kết quả này chỉ được sử dụng để tham khảo, không phải là cơ sở để so sánh trực tiếp mức độ hoạt tính.

Nhìn chung, bột vi bao BLMH thể hiện khả năng ức chế các vi sinh vật khảo sát, nhưng các giá trị MIC thu được còn khá cao. Vì vậy, kết quả này chỉ mang ý nghĩa sàng lọc ban đầu. Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của vật liệu bao, khả năng giải phóng hoạt chất và so sánh với cao chiết tự do để đánh giá đầy đủ hơn hoạt tính kháng vi sinh vật và tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

d. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro*

Kết quả ở Bảng 3.31 cho thấy bột vi bao BLMH thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* rõ rệt trên tất cả các dòng tế bào khảo sát. Ở nồng độ sàng lọc 100 µg/mL, mẫu thử cho thấy khả năng ức chế tăng trưởng đặc biệt cao. Đặc biệt, trên dòng tế bào ung thư tụy BxPC3, giá trị ức chế đạt 117 ± 3%, phản ánh mức độ tác động mạnh của mẫu đối với dòng tế bào này.

Giá trị GI_{50} của mẫu nằm trong khoảng 6,33–12,7 µg/mL trên các dòng tế bào ung thư, cho thấy hiệu lực ức chế tăng sinh ở mức cao. Trong đó, mẫu thể hiện hoạt tính mạnh nhất trên dòng MDAMB468 (GI_{50} = 6,33±0,93 µg/mL), tiếp theo là các dòng MCF-7 và T47D (GI_{50} lần lượt là 7,32±1,93 và 7,67±0,44 µg/mL). Các dòng HER2 dương tính như SKBR3 và BT474 cũng bị ức chế đáng kể với GI_{50} xấp xỉ 12 µg/mL. Đáng chú ý, mẫu vẫn duy trì hoạt tính trên các dòng triple-negative (MDAMB231 và MDAMB468), là nhóm tế bào có tính xâm lấn cao và khó điều trị, cho thấy tiềm năng sinh học đáng kể của hệ vi bao.

Tuy nhiên, giá trị GI_{50} trên dòng tế bào bình thường MCF10A (12,3±1,1 µg/mL) tương đương với một số dòng ung thư, cho thấy tính chọn lọc của mẫu chưa cao. Điều này cho thấy cần tiếp tục tối ưu hóa hệ vi bao hoặc liều lượng nhằm cải thiện khả năng phân biệt giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường.

Bảng 3. 31. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* của bột vi bao BLMH

Dòng tế bào ung thư (loại tế bào)	% ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ 100 µg/mL	GI_{50} (µg/mL)
MCF-7 (Vú, ER dương tính)	>100	7,32 ± 1,93
MDAMB231 (Vú, TNBC)	>100	12,7 ± 0,4
T47D (Vú, ER dương tính)	>100	7,67 ± 0,44
ZR-75-1 (Vú, ER dương tính)	>100	12,0 ± 2,0
SKBR3 (Vú, HER2 dương tính)	>100	12,5 ± 1,0
BT474 (Vú, HER2 dương tính)	>100	12,0 ± 0,5
BT20 (Vú, ER âm tính)	>100	10,7 ± 2,7
MDAMB468 (Vú, TNBC)	>100	6,33 ± 0,93
MCF10A (Vú bình thường)	>100	12,3 ± 1,1
BxPC3 (Tuyến tụy)	117 ± 3	11,7 ± 0,3

TNBC: Ung thư vú âm tính thể ba, ER Pos/Neg: Dương tính/Âm tính với thụ thể Estrogen, HER2 Pos: Dương tính với thụ thể HER2. Giá trị % ức chế tăng trưởng càng cao thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của tế bào càng lớn. Giá trị >100 cho thấy sự tăng trưởng của tế bào đã bị ức chế hoàn toàn, bao gồm cả việc gây chết tế bào. GI_{50} là nồng độ ức chế 50% sự tăng trưởng của tế bào (giá trị này càng thấp thì khả năng ức chế tăng trưởng càng mạnh).

Hiệu lực mạnh này có thể được lý giải từ đặc tính hóa học đặc trưng của BLMH. Khác với ĐS vốn giàu polyphenol tan trong nước, dịch chiết BLMH chứa hàm lượng cao các saponin steroid thuộc nhóm polyphyllin – có hoạt tính kháng ung thư mạnh, điều này giải thích vì sao BLMH có thể ức chế mạnh TNBC – một dạng ung thư hầu như không phụ thuộc hormone tăng trưởng và thường không đáp ứng tốt với các chất chống oxy hóa đơn thuần. Nhờ khả năng can thiệp trực tiếp vào các cơ chế sống còn nội bào, BLMH biểu hiện vai trò như một tác nhân gây độc tế bào chủ động chứ không chỉ điều hòa chuyển hóa oxy hóa khử như một số dược liệu khác.

So với nghiên cứu vi bao dịch chiết *Sechium edule* bằng chitosan [211], trong đó IC_{50} đạt khoảng 8 µg/mL nhưng chỉ được đánh giá trên một dòng ung thư cổ tử cung HeLa, bột vi bao BLMH cho thấy hiệu lực tương đương hoặc cao hơn, đồng thời vượt trội về mức độ toàn diện khi được khảo sát trên nhiều phân nhóm ung thư vú khác nhau (ER^+, $HER2^+$ và TNBC)

Nhìn chung, bột vi bao BLMH thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư *in vitro* mạnh trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau, bao gồm cả các dòng khó điều trị. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng của bột vi bao BLMH trong nghiên cứu phát triển các tác nhân hỗ trợ phòng ngừa hoặc điều trị ung thư. Tuy nhiên, cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu nhằm làm rõ cơ chế tác động *in vitro* (apoptosis, cell cycle, Western blot, qPCR), đồng thời đánh giá độc tính và hiệu quả *in vivo* để khẳng định hiệu quả dược học của bột vi bao. Đây là cơ sở khoa học quan trọng cho việc phát triển các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trong tương lai.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nhìn chung, luận án đã hoàn thành đầy đủ các nội dung và đạt được các mục tiêu nghiên cứu đã đề ra, với các kết quả thu được phù hợp với định hướng và phạm vi nghiên cứu ban đầu.

4.1.1. Điều kiện sấy rễ ĐS và thân rễ BLMH

Đối với rễ ĐS, sấy vi sóng ở công suất 720 W cho hiệu quả tốt với thời gian sấy ngắn, hoạt độ nước thấp, hiệu suất chiết cao và khả năng bảo toàn hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa tốt.

Đối với thân rễ BLMH, sấy không khí nóng ở 60 °C được xác định là phù hợp, đảm bảo cân bằng giữa thời gian sấy, chất lượng cảm quan và khả năng duy trì hoạt chất sinh học.

4.1.2. Điều kiện chiết tối ưu rễ ĐS và thân rễ BLMH

Điều kiện chiết tối ưu đối với rễ ĐS là: Chiết hỗ trợ siêu âm bằng dung môi ethanol 80% v/v, nhiệt độ chiết 40 °C, thời gian chiết 27 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/88 (g/mL). Tại điều kiện này, hàm lượng saponin tổng (TSC), hiệu suất chiết saponin (SEE), hàm lượng phenolic tổng (TPC), khả năng bắt gốc tự do ABTS (ARSC) và khả năng khử sắt (FRAP) lần lượt đạt 68,64 mg EE/g DM; 86,07%; 42,19 mg GAE/g DM; 91,24 mg TE/g DM và 85,67 mg TE/g DM.

Điều kiện chiết tối ưu đối với thân rễ BLMH là: Chiết hỗ trợ vi sóng (MAE) với dung môi ethanol 80% v/v, thời gian chiết 27 phút và thời gian bức xạ 8 giây/phút, công suất vi sóng 600 W và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 (g/mL). Tại điều kiện này, TSC, SEE, TPC, ARSC và FRAP lần lượt đạt 65,74 mg EE/g DM; 82,44%; 0,91 mg GAE/g DM; 4,45 mg TE/g DM và 1,21 mg TE/g DM.

4.1.3. Công thức tạo bột vi bao từ dịch chiết rễ ĐS và thân rễ BLMH

Đối với dịch chiết cô đặc rễ ĐS: tỷ lệ chất khô dịch cô/chất bao là 40/60 (w/w) và tỷ lệ các chất bao MD/GA/MCS/PEC là 5/1/3/1.

Đối với dịch chiết cô đặc thân rễ BLMH: tỷ lệ chất khô dịch cô/chất bao được lựa chọn là 40/60 (w/w) và tỷ lệ MD/GA/MCS/PEC là 3/1/5/1.

Bột vi bao thu được đã được đặc trưng về cấu trúc và tính chất lý hóa bằng SEM, DLS, DSC, TGA và XRD; đồng thời, các chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại nặng nằm trong giới hạn cho phép. Sản phẩm thể hiện khả năng chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của một số dòng tế bào *in vitro* và khả năng ức chế các vi sinh vật khảo sát.

4.2. Khuyến nghị

Từ các kết quả đạt được và những hạn chế còn tồn tại của luận án, một số định hướng nghiên cứu tiếp theo được đề xuất như sau:

Thứ nhất, đánh giá toàn diện hiệu quả kinh tế – kỹ thuật của quy trình công nghệ, bao gồm phân tích chi phí năng lượng ở các công đoạn sấy, chiết tách hỗ trợ siêu âm/vi sóng và sấy chân không tạo bột vi bao. Việc xây dựng mô hình cân bằng vật chất và năng lượng ở quy mô pilot là bước đi cần thiết để ước tính giá thành sản phẩm, đồng thời so sánh với giá trị gia tăng từ việc bảo tồn hàm lượng hoạt chất và hoạt tính sinh học. Đây sẽ là cơ sở thực tiễn quan trọng để khẳng định khả năng thương mại hóa và ứng dụng quy trình vào thực tế sản xuất quy mô công nghiệp.

Thứ hai, mở rộng nghiên cứu về độ ổn định và sinh khả dụng của sản phẩm trong các hệ thực phẩm cụ thể, thông qua việc đánh giá độ ổn định của hoạt chất trong quá trình bảo quản, khả năng giải phóng và tính khả dụng sinh học, từ đó hoàn thiện cơ sở khoa học cho việc phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng.

Thứ ba, cần tiếp tục làm rõ mối liên hệ giữa thành phần hoạt chất và cơ chế biểu hiện hoạt tính sinh học, đặc biệt là cơ chế ức chế tăng sinh tế bào ung thư, nhằm nâng cao độ tin cậy khoa học trong việc đánh giá tiềm năng ứng dụng của sản phẩm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Bài báo khoa học

1. [redacted] (2024), "Physicochemical, phytochemical and antioxidant properties of medicinal plant roots Dan sam (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) prepared under different drying conditions", *Cogent Food & Agriculture*, 10(1), 2420843, DOI: 10.1080/23311932.2024.2420843

2. [redacted] (2025), "Preparation of medicinal plant rhizome Bay la mot hoa (*Paris polyphylla* Smith) under various drying conditions", *Cogent Food & Agriculture*, 11(1), 2518217, DOI: 10.1080/23311932.2025.2518217

3. [redacted] (2026), "Tối ưu hóa điều kiện trích ly hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hóa từ rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)", *Tạp chí KH và CN Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội*, 62(3), 244-252.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2005), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 4830-1:2005) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loài khác) trên đĩa thạch - Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch Baird-Parker.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ (2013), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 4884-1:2015) - Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 độ C bằng kỹ thuật đổ đĩa.
3. Bộ Khoa học và Công nghệ (2005), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 4991:2005) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng *Clostridium perfringens* trên đĩa thạch - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.
4. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 6848:2007) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.
5. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7603:2007) - Thực phẩm - Xác định hàm lượng cadimi bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.
6. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7604:2007) - Thực phẩm - Xác định hàm lượng thủy ngân bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa.
7. Bộ Khoa học và Công nghệ (2008), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7924-2:2008) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - phương pháp định lượng *Escherichia Coli* dương tính β-glucuronidaza - phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44^{O}C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl β-d-glucuronid.
8. Bộ Khoa học và Công nghệ (2009), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 8126:2009) - Thực phẩm - Xác định chì, cadimi, kẽm, đồng và sắt - phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử sau khi đã phân hủy bằng vi sóng.
9. Bộ Khoa học và Công nghệ (2010), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 8275-2:2010) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.
10. Bộ Khoa học và Công nghệ (2012), Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 9521:2012) - Thực phẩm - Xác định hàm lượng asen tổng số và hàm lượng selen bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử hydrua hóa (HGAAS) sau khi phân hủy bằng áp lực.
11. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Như, Nguyễn Tập and Trần Toàn (2006), Phần 1: Cây thuốc, in: *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Phạm Thái Xuyên, Editor, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. pp. 182--184, 732-738.
12. Đỗ Tất Lợi (2004), Phần II: Những cây thuốc và vị thuốc, in: *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Đặng Thế Vĩnh, Editor, NXB Y học, Hà Nội. pp. 90-92, 818-820.
13. Đoàn Mạnh Dũng, Đặng Thị Ngần, Nguyễn Thị Huệ, Lê Quốc Hùng, Nguyễn Hữu Tùng, Nguyễn Đình Luyện and Trần Đình Thắng (2019), "Phân lập và xác định hàm lượng tanshinon I, cryptotanshinon, tanshinon IIA trong dược liệu cây Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* B.) bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC-DAD)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 137, pp. 100-105.

14. Nguyễn Hữu Tùng (2016), "*Nghiên cứu dược liệu Đan sâm (Salvia miltiorrhiza Bunge) trồng ở Việt Nam: thành phần hóa học và tác dụng trên các dòng tế bào ung thư máu*", Báo cáo kết quả nghiên cứu của Đề tài NAFOSTED, Mã số: 106-YS.05-2015.05,: Hà Nội.

15. Nguyễn Thị Ngọc Thúy, Nguyễn Thị Thu Huyền, Trương Quang Duy, Phan Huỳnh Thúy Nga and Cao Thị Cẩm Tú (2018), "Ảnh hưởng của dung môi và pH đến quá trình trích ly các hợp chất có khả năng kháng oxy hóa từ tía tô (*Perilla frutescens*)", *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 14(1), pp. 66-74.

16. Nguyễn Thị Vân Anh, Trần Thanh Quỳnh Anh, Nguyễn Văn Huế, Trương Thị Kiều Giang, Phạm Xuân Phương and Đoàn Thị Thanh Thảo (2022), "Vi bao Asiaticoside từ dịch chiết rau má bằng kỹ thuật sấy phun", *Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*.

17. Nguyễn Văn Tặng, Huỳnh Thị Việt Ngân and Đoàn Thị Hiệp (2024), "Ảnh hưởng của tinh bột ngô biến tính và pectin đến tính chất hóa lý, hoạt chất sinh học, hoạt tính chống ôxy hóa và ức chế enzyme α-glucosidase của bột vi bao giàu hoạt chất sinh học từ vỏ quả ca cao (*Theobroma cacao* L.)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội*, 60(11), pp. 184-193.

18. Trần Trọng Biên, Phạm Thị Linh Giang and Phạm Thái Hà Văn (2021), "Nghiên cứu chiết xuất cao rễ đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) giàu tanshinone sử dụng nhựa hấp phụ macroporous", *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 37(3).

19. Vũ Bá Minh (chủ biên) and Võ Văn Bang (2013), *Quá trình và Thiết bị trong Công nghệ hóa học và Thực phẩm*. Vol. 3. Nhà xuất bản ĐHQG TP.HCM, pp. 224-268, 269-312.

20. Vũ Thị Thu Thủy (2017), "Đặc điểm sinh học và giá trị dược học của cây Bảy lá một hoa thuộc chi Paris", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - Trường Đại học Thái Nguyên*, 171(11), pp. 49-54.

21. Acworth I., Plante M., Bailey B., Crafts C. and Waraska J. (2011), "Simple and direct analysis of falcarinol and other polyacetylenic oxylipins in carrots by reversed-phase HPLC and charged aerosol detection", *Planta Medica*, 77(12), pp. 1-5.

22. Ahmadi F., Suleria H.A. and Dunshea F.R. (2025), "Physicochemical characterization, storage stability behavior, and intestinal bioaccessibility of clove extract encapsulated using varying combinations of gum Arabic and maltodextrin", *Foods*, 14(2), pp. 237.

23. Ai C.-B. and Li L.-N. (1992), "Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*", *Planta Medica*, 58(02), pp. 197-199.

24. Amarowicz R. (2009), "Antioxidant activity of Maillard reaction products", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), pp. 109-111.

25. An K., Zhao D., Wang Z., Wu J., Xu Y. and Xiao G. (2016), "Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure", *Food Chemistry*, 197, pp. 1292-1300.

26. Andrich G., Balzini S., Zinnai A., De Vitis V., Silvestri S., Venturi F. and Fiorentini R. (2001), "Supercritical fluid extraction in sunflower seed technology", *European journal of lipid science and technology*, 103(3), pp. 151-157.

27. AOAC (1995), *Official Methods of Analysis*, 16th, Washington, D.C., Association of Official Analytical Chemists.

28. Aquino G., Basilicata M.G., Crescenzi C., Vestuto V., Salviati E., Cerrato M., Ciaglia T., Sansone F., Pepe G. and Campiglia P. (2023), "Optimization of microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from spring onion leaves using Box–Behnken design", *Scientific Reports*, 13(1), pp. 14923.

29. Azaroual L., Liazid A., Mansouri F.E., Brigui J., Ruíz-Rodriguez A., Barbero G.F. and Palma M. (2021), "Optimization of the microwave-assisted extraction of simple phenolic compounds from grape skins and seeds", *Agronomy*, 11(8), pp. 1527.

30. Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N. and Omar A. (2013), "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review", *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp. 426-436.

31. Azwanida N.N. (2015), "A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation", *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(196), pp. 2167-0412.

32. Balouiri M., Sadiki M. and Ibnsouda S.K. (2016), "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), pp. 71-79.

33. Benzie I.F.F. and Strain J.J. (1999), "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration", *Methods in enzymology*, 299, pp. 15-27.

34. Bhalodia N.R. and Shukla V.J. (2011), "Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l.: An ethnomedicinal plant", *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), pp. 104.

35. Bhattacharjee S. (2016), "DLS and zeta potential–what they are and what they are not?", *Journal of controlled release*, 235, pp. 337-351.

36. Böttger S. and Melzig M.F. (2013), "The influence of saponins on cell membrane cholesterol", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22), pp. 7118-7124.

37. Brand-Williams W., Cuvelier M.-E. and Berset C. (1995), "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), pp. 25-30.

38. Cai M., Guo Y., Wang S., Wei H., Sun S., Zhao G. and Dong H. (2017), "Tanshinone IIA elicits neuroprotective effect through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-dependent antioxidant response", *Rejuvenation Research*, 20(4), pp. 286-297.

39. Calín-Sánchez Á., Lipan L., Cano-Lamadrid M., Kharaghani A., Masztalerz K., Carbonell-Barrachina Á.A. and Figiel A. (2020), "Comparison of traditional and novel drying techniques and its effect on quality of fruits, vegetables and aromatic herbs", *Foods*, 9(9), pp. 1261.

40. Calixto J.B. (2000), "Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, pp. 179-189.

41. Cano-Higuita D.M., Vélez H.A.V. and Telis V.R.N. (2015), "Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch", *Ciência e Agrotecnologia*, 39(2), pp. 173-182.

42. Cano H., Diana M., Malacrida C. and Telis V. (2015), "Stability of curcumin microencapsulated by spray and freeze drying in binary and ternary matrices of maltodextrin, gum arabic and modified starch", *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), pp. 2049-2060.

43. Cano H., Diana M., Vélez H., Alexander V., Telis V. and Regina N. (2015), "Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch", *Ciência e Agrotecnologia*, 39(2), pp. 173-182.

44. Cao H., Zhang L., Sun Z.B., Cheng X.H., Zhang Y. and Zou H.B. (2015), "*Salvia miltiorrhiza* prevents deep vein thrombosis via antioxidative effects in endothelial cells", *Molecular Medicine Reports*, 11(5), pp. 3593-3600.

45. Chan J.Y.W., Koon J.C.M., Liu X., Detmar M., Yu B., Kong S.K. and Fung K.P. (2011), "Polyphyllin D, a steroidal saponin from *Paris polyphylla*, inhibits endothelial cell functions in vitro and angiogenesis in zebrafish embryos in vivo", *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), pp. 64-69.

46. Chan K.W.K. and Ho W.S. (2015), "Anti-oxidative and hepatoprotective effects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage in vitro and in vivo", *Oncology Reports*, 34(2), pp. 673-680.

47. Chang J., Wang H., Wang X., Zhao Y., Zhao D., Wang C., Li Y., Yang Z., Lu S. and Zeng Q. (2015), "Molecular mechanisms of Polyphyllin I-induced apoptosis and reversal of the epithelial–mesenchymal transition in human osteosarcoma cells", *Journal of Ethnopharmacology*, 170, pp. 117-127.

48. Chang Y., Zhang W., Xie Y., Xu X., Sun R., Wang Z. and Yan R. (2014), "Postmarketing safety evaluation: depside salt injection made from Danshen (Radix *Salviae Miltiorrhizae*)", *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(6), pp. 749-753.

49. Chen B.C., Ding Z.S., Dai J.S., Chen N.P., Gong X.W., Ma L.F. and Qian C.D. (2021), "New insights into the antibacterial mechanism of cryptotanshinone, a representative diterpenoid quinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge", *Frontiers in Microbiology*, 12, pp. 372.

50. Chen C.P., Yokozawa T. and Chung H.Y. (1999), "Inhibitory effect of caffeic acid analogues isolated from *Salvia Miltiorrhiz*a Radix against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51(1), pp. 59-63.

51. Chen D., Xing B., Yi H., Li Y., Zheng B., Wang Y. and Shao Q. (2020), "Effects of different drying methods on appearance, microstructure, bioactive compounds and aroma compounds of saffron (*Crocus sativus* L.)", *LWT*, 120, pp. 108913.

52. Chen G., Fu Y. and Wu X. (2012), "Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* extract against renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats", *Molecules*, 17(2), pp. 1191-1202.

53. Chen X., Guo J., Bao J., Lu J. and Wang Y. (2014), "The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review", *Medicinal Research Reviews*, 34(4), pp. 768-794.

54. Chen X., Li Q., He Y., Du H., Zhan Z., Zhao H., Shi J., Ye Q. and Hu J.a. (2017), "15, 16-dihydrotanshinone I induces apoptosis and inhibits the proliferation, migration of human osteosarcoma cell line 143B in vitro", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 17(9), pp. 1234-1242.

55. Chen Y.H., Lin S.J., Ku H.H., Shiao M.S., Lin F.Y., Chen J.W. and Chen Y.L. (2001), "Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-α-treated human aortic endothelial cells", *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(3), pp. 512-521.

56. Chen Z. and Xu H. (2014), "Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanism of tanshinone IIA for atherosclerosis", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

57. Cheung J.Y.-N., Ong R.C.-Y., Suen Y.-K., Ooi V., Wong H.N.-C., Mak T.C.-W., Fung K.-P., Yu B. and Kong S.-K. (2005), "Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells", *Cancer letters*, 217(2), pp. 203-211.

58. Choudhury N., Meghwal M. and Das K. (2021), "Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods", *Food Frontiers*, 2(4), pp. 426-442.

59. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Vol.38 (24).

60. Clinical and Laboratory Standards Institute (2017), Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Vol.37 (13).

61. Clinical and Laboratory Standards Institute (2016), Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Vol.30

62. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Vol.38 (2).

63. Commission C.P. (2015), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 10. Vol. I. Beijing, China, China Medical Science Press.

64. Dai L., Hou J. and Cai H. (2004), "Experimental study on treatment of pulmonary fibrosis by Chinese drugs and integrative Chinese and Western medicine", *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 24(2), pp. 130-132.

65. Dean J., Liu B. and Price R. (1998), "Extraction of Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge using supercritical fluid extraction and a new extraction technique, phytosol solvent extraction", *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), pp. 343-348.

66. Delaporte A., Duchemin B., Grisel M. and Gore E. (2024), "Impact of wall material-to-active ratio in the stability of spray-dried ascorbic acid using maltodextrin and gum arabic", *Molecules*, 29(15), pp. 3587.

67. Deng B., Liu Z. and Zou Z. (2019), "Optimization of microwave-assisted extraction saponins from *Sapindus mukorossi* Pericarps and an Evaluation of their inhibitory activity on xanteine oxidase", *Journal of chemistry*, 2019(1), pp. 5204534.

68. Deng D., Lauren D.R., Cooney J.M., Jensen D.J., Wurms K.V., Upritchard J.E., Cannon R.D., Wang M.Z. and Li M.Z. (2008), "Antifungal saponins from *Paris polyphylla* Smith", *Planta Medica*, 74(11), pp. 1397-402.

69. Deng Y., Liu G., Zhang H., Zhou P., Tang X., Li P., Zhao Z., Zhang Y., Wang Z. and Wei Z. (2024), "Effects of wall materials on the physicochemical properties of spray-dried bitter gourd (Momordica charantia L.) powders", *npj Science of Food*, 8(1), pp. 37.

70. Devi W.J., Laishram J.M. and Chakraborty S. (2018), "Antioxidant activity and polyphenol contents of *Paris polyphylla* Smith and prospects of in situ conservation", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(5), pp. 2355-2367.

71. Devkota K.P., Khan M.T.H., Ranjit R., Meli Lannang A., Samreen and Iqbal Choudhary M. (2007), "Tyrosinase inhibitory and antileishmanial constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla*", *Natural Product Research*, 21(4), pp. 321-327.

72. Dickinson E. (2003), "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems", *Food hydrocolloids*, 17(1), pp. 25-39.

73. Ding C., Zhao Y., Shi X., Zhang N., Zu G., Li Z., Zhou J., Gao D., Lv L. and Tian X. (2016), "New insights into salvianolic acid A action: Regulation of the TXNIP/NLRP3 and TXNIP/ChREBP pathways ameliorates HFD-induced NAFLD in rats", *Scientific reports*, 6(1), pp. 28734.

74. Ding L., Wang S., Qu X. and Wang J. (2016), "Tanshinone IIA sensitizes oral squamous cell carcinoma to radiation due to an enhanced autophagy", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 46, pp. 264-269.

75. Ding Y.G., Zhao Y.L., Zhang J., Zuo Z.T., Zhang Q.Z. and Wang Y.Z. (2021), "The traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Paris* L.(Liliaceae): A review", *Journal of Ethnopharmacology*, 278, pp. 114293.

76. Dolatpanah M., Rashtchizadeh N., Abbasi M.M., Nazari S., Mohammadian J., Roshangar L., Argani H. and Ghorbanihaghjo A. (2022), "Falcarindiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through the modulation of NF-kB and Nrf2 signaling pathways in mice".

77. Dong R., Zhang Z., Zhou Y. and Guo J. (2018), "The effect of Polyphyllin I on gastric cancer-associated fibroblasts", *Journal of Clinical Oncology*, 24, pp. 336-340.

78. Fang Z. and Bhandari B. (2010), "Encapsulation of polyphenols–a review", *Trends in food science & technology*, 21(10), pp. 510-523.

79. Feng F.-F., Cheng P., Sun C., Wang H. and Wang W. (2019), "Inhibitory effects of Polyphyllins I and VII on human cisplatin-resistant NSCLC via p53 upregulation and CIP2A/AKT/mTOR signaling axis inhibition", *Chinese Journal of Natural Medicines (English Ed.)*, pp. 768-777.

80. Feng J., Li S. and Chen H. (2016), "Tanshinone IIA inhibits myocardial remodeling induced by pressure overload via suppressing oxidative stress and inflammation: possible role of silent information regulator 1", *European Journal of Pharmacology*, 791, pp. 632-639.

81. Figura L.O. and Teixeira A.A. (2023), Water activity, in: *Food Physics: Physical Properties-Measurement and Applications*Springer Science & Business Media, New York. pp. 1-57.

82. Gaidhani K.A., Harwalkar M., Bhambere D. and Nirgude P.S. (2015), "Lyophilization/freeze drying–a review", *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), pp. 516-543.

83. Ge M., Liu H., Zhang Y., Li N., Zhao S., Zhao W., Zhen Y., Yu J., He H. and Shao R.g. (2017), "The anti-hepatic fibrosis effects of dihydrotanshinone I are mediated by disrupting the yes-associated protein and transcriptional enhancer factor D2 complex and stimulating autophagy", *British Journal of Pharmacology*, 174(10), pp. 1147-1160.

84. Gordon M. and Weng X. (1992), "Antioxidant properties of extracts from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)", *Food Chemistry*, 44(2), pp. 119-122.

85. Graham J., Quinn M., Fabricant D. and Farnsworth N. (2000), "Plants used against cancer–an extension of the work of Jonathan Hartwell", *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), pp. 347-377.

86. Griep P., da Silva L.M., Tres B.P., Colet R., Junges A., Steffens C., Zeni J. and Valduga E. (2023), "Effects of encapsulating agents and temperature in the microencapsulation of carotenogenic extracts from *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 and storage stability", *Biointerface research in applied chemistry*, 13(5), pp. 449-462.

87. Guan L., Ju B., Zhao M., Zhu H., Chen L., Wang R., Gao H. and Wang Z. (2021), "Influence of drying process on furostanoside and spirostanoside profiles of Paridis Rhizoma by combination of HPLC, UPLC and UPLC-QTOF-MS/MS analyses", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197, pp. 113932.

88. Gülcin I. (2012), "Antioxidant activity of food constituents: an overview", *Archives of Toxicology*, 86, pp. 345-391.

89. Gunalan S., Thangaiah A., Janaki J.G., Thiyagarajan A., Kuppusamy S. and Arunachalam L. (2022), "Optimization of microwave-assisted extraction method for increased extraction yield and total phenol content from moringa leaves (Moringa oleifera Lam.) var. PKM 1", *Advances in Agriculture*, 2022(1), pp. 7370886.

90. Guo L., Su J., Deng B., Yu Z., Kang L., Zhao Z., Shan Y., Chen J., Ma B. and Cong Y. (2008), "Active pharmaceutical ingredients and mechanisms underlying phasic myometrial contractions stimulated with the saponin extract from Paris polyphylla Sm. var. yunnanensis used for abnormal uterine bleeding", *Human reproduction*, 23(4), pp. 964-971.

91. Han S.S., Ji S.M., Park M.J., Suneetha M. and Uthappa U.T. (2022), "Pectin based hydrogels for drug delivery applications: a mini review", *Gels*, 8(12), pp. 834.

92. Hayat K., Zhang X., Chen H., Xia S., Jia C. and Zhong F. (2010), "Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity", *Separation and Purification Technology*, 73(3), pp. 371-376.

93. He H., Tang H., Gao L., Wu Y., Feng Z., Lin H. and Wu T. (2015), "Tanshinone IIA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats", *Molecular Medicine Reports*, 11(6), pp. 4190-4196.

94. He H., Xu C., Zheng L., Wang K., Jin M., Sun Y. and Yue Z. (2020), "Polyphyllin VII induces apoptotic cell death via inhibition of the PI3K/Akt and NF-κB pathways in A549 human lung cancer cells", *Molecular Medicine Reports*, 21(2), pp. 597-606.

95. He L., Zhang Q., Lü X. and Li X. (2017), "Effects of water extract of *Salvia miltiorrhiza* aganst renal injury on rats exposed to cadmium", *Zhonghua yi xue za zhi*, 97(1), pp. 57-61.

96. He S., Wang X., Chen J., Li X., Gu W., Zhang F., Cao G. and Yu J. (2022), "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), pp. 1463.

97. Hernández Y., Lobo M.G. and González M. (2009), "Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple", *Food Chemistry*, 114(2), pp. 734-741.

98. Hiai S., Oura H. and Nakajima T. (1976), "Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid", *Planta Medica*, 29(02), pp. 116-122.

99. Ho J.H.-C. and Hong C.-Y. (2011), "Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection", *Journal of Biomedical Science*, 18(1), pp. 1-5.

100. Hossain M.B., Brunton N.P. and Rai D.K. (2016), "Effect of drying methods on the steroidal alkaloid content of potato peels, shoots and berries", *Molecules*, 21(4), pp. 403.

101. Hu H., Zhai C., Qian G., Gu A., Liu J., Ying F., Xu W., Jin D., Wang H. and Hu H. (2015), "Protective effects of tanshinone IIA on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction", *Pharmaceutical Biology*, 53(12), pp. 1752-1758.

102. Hu J., Li Y.-L., Li Z.-L., Li H., Zhou X.-X., Qiu P.-C., Yang Q. and Wang S.-W. (2012), "Chronic supplementation of paeonol combined with danshensu for the improvement of vascular reactivity in the cerebral basilar artery of diabetic rats", *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), pp. 14565-14578.

103. Hu Y., Li Y., Zhang W., Kou G. and Zhou Z. (2018), "Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in arabic gum-stabilized microcapsules: Modulation of whey protein concentrate", *Food Hydrocolloids*, 77, pp. 588-597.

104. Huang M., Xie Y., Chen L., Chu K., Wu S., Lu J., Chen X., Wang Y. and Lai X. (2012), "Antidiabetic effect of the total polyphenolic acids fraction from *Salvia miltiorrhiza* Bunge in diabetic rats", *Phytotherapy Research*, 26(6), pp. 944-948.

105. Huang Z., Zeng C., Zhu L., Jiang L., Li N. and Hu H. (2010), "Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(6), pp. 1383-1393.

106. Ibtissem H.S., Fatma Z.R., Iness B.R., Soumaya B., Ferid L. and Brahim M. (2013), "Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods", *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), pp. 806-817.

107. Indiarto R., Asyifaa A.H., Adiningsih F.C.A., Aulia G.A. and Achmad S.R. (2021), "Conventional and advanced food-drying technology: A current review", *International Journal of Scientific & Technology Research*, 10(1), pp. 99-107.

108. ISO 22412:2017 (2017), Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS).

109. Jafari S.M., Assadpoor E., He Y. and Bhandari B. (2008), "Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying", *Drying technology*, 26(7), pp. 816-835.

110. Jia Z., Zhao C., Wang M., Zhao X., Zhang W., Han T., Xia Q., Han Z., Lin R. and Li X. (2020), "Hepatotoxicity assessment of Rhizoma Paridis in adult zebrafish through proteomes and metabolome", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, pp. 109558.

111. Jiang C., Shao Q., Jin B., Gong R., Zhang M. and Xu B. (2015), "Tanshinone IIA attenuates renal fibrosis after acute kidney injury in a mouse model through inhibition of fibrocytes recruitment", *BioMed Research International*, 2015.

112. Jiang C., Zhu W., Shao Q., Yan X., Jin B., Zhang M. and Xu B. (2016), "Tanshinone IIA protects against folic acid-induced acute kidney injury", *The American Journal of Chinese Medicine*, 44(04), pp. 737-753.

113. Jiang F., Wang J., Deng D. and Liu X. (2014), "Effects of polyphyllin II on nude mouse bearing human urothelial carcinoma of bladder", *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 29(10), pp. 3208-3211.

114. Jiang R.-W., Lau K.-M., Hon P.-M., Mak T.C., Woo K.-S. and Fung K.-P. (2005), "Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*", *Current Medicinal Chemistry*, 12(2), pp. 237-246.

115. Jin H.R., Zhao J., Zhang Z., Liao Y., Wang C.Z., Huang W.H., Li S.P., He T.C., Yuan C.S. and Du W. (2012), "The antitumor natural compound falcarindiol promotes cancer cell death by inducing endoplasmic reticulum stress", *Cell Death and Disease*, 3(8), pp. e376-e376.

116. Jin Q., Jiang S., Wu Y.-L., Bai T., Yang Y., Jin X., Lian L.-H. and Nan J.-X. (2014), "Hepatoprotective effect of cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* in D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure", *Phytomedicine*, 21(2), pp. 141-147.

117. Johnson I.T., Gee J.M., Price K., Curl C. and Fenwick G.R. (1986), "Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro", *The Journal of Nutrition*, 116(11), pp. 2270-2277.

118. Joshi B., Panda S.K., Jouneghani R.S., Liu M., Parajuli N., Leyssen P., Neyts J. and Luyten W. (2020), "Antibacterial, antifungal, antiviral, and anthelmintic activities of medicinal plants of Nepal selected based on ethnobotanical evidence", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.

119. Kang D.G., Oh H., Sohn E.J., Hur T.Y., Lee K.C., Kim K.J., Kim T.Y. and Lee H.S. (2004), "Lithospermic acid B isolated from *Salvia miltiorrhiza* ameliorates ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats", *Life Sciences*, 75(15), pp. 1801-1816.

120. Kang D.G., Yun Y.G., Ryoo J.H. and Lee H.S. (2002), "Anti-hypertensive effect of water extract of danshen on renovascular hypertension through inhibition of the renin angiotensin system", *The American journal of Chinese medicine*, 30(01), pp. 87-93.

121. Kang L.P., Liu Y.X., Eichhorn T., Dapat E., Yu H., Zhao Y., Xiong C.Q., Liu C., Efferth T. and Ma B.P. (2012), "Polyhydroxylated steroidal glycosides from *Paris polyphylla*", *Journal of Natural Products*, 75(6), pp. 1201-1205.

122. Kapalavavi B., Doctor N., Zhang B. and Yang Y. (2021), "Subcritical water extraction of *Salvia miltiorrhiza*", *Molecules*, 26(6), pp. 1634.

123. Karaman S., Toker O.S., Çam M., Hayta M., Doğan M. and Kayacier A. (2014), "Bioactive and physicochemical properties of persimmon as affected by drying methods", *Drying Technology*, 32(3), pp. 258-267.

124. Kha T.C., Nguyen M.H., Roach P.D. and Stathopoulos C.E. (2014), "Microencapsulation of gac oil by spray drying: optimization of wall material concentration and oil load using response surface methodology", *Drying Technology*, 32(4), pp. 385-397.

125. Khoang L.T., Huyen H.T.T., Chung H.V., Duy L.X., Toan T.Q., Bich H.T., Minh P.T.H., Pham D.T.N. and Hien T.T. (2022), "Optimization of total saponin extraction from polyscias fruticosa roots using the ultrasonic-assisted method and response surface methodology", *Processes*, 10(10), pp. 2034.

126. Kim E.-O., Kang S.E., Im C.R., Lee J.-H., Ahn K.S., Yang W.M., Um J.-Y., Lee S.-G. and Yun M. (2016), "Tanshinone IIA induces TRAIL sensitization of human lung cancer cells through selective ER stress induction", *International Journal of Oncology*, 48(5), pp. 2205-2212.

127. Kim J.J. and Kim W.Y. (2013), "Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng", *Journal of Ginseng research*, 37(1), pp. 117.

128. Krapfenbauer G., Kinner M., Gössinger M., Schönlechner R. and Berghofer E. (2006), "Effect of thermal treatment on the quality of cloudy apple juice", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), pp. 5453-5460.

129. Kubra I.R. and Rao L.J.M. (2012), "An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (Zingiber officinale Roscoe)", *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(8), pp. 651-688.

130. Kumar K., Srivastav S. and Sharanagat V.S. (2021), "Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review", *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, pp. 105325.

131. Kumaran A. and Karunakaran R.J. (2007), "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India", *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), pp. 344-352.

132. Kunwar R.M., Adhikari Y.P., Sharma H.P., Rimal B., Devkota H.P., Charmakar S., Acharya R.P., Baral K., Ansari A.S., Bhattarai R., Thapa-Magar S., Paudel H.R., Baral S., Sapkota P., Uprety Y., LeBoa C. and Jentsch A. (2020), "Distribution, use, trade and conservation of *Paris polyphylla* Sm. in Nepal", *Global Ecology and Conservation*, 23, pp. e01081.

133. Kwon J.-H., Bélanger J.M. and Paré J.J. (2003), "Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), pp. 1807-1810.

134. Lee M.S., Yuet Wa J.C., Kong S.K., Yu B., Eng Choon V.O., Nai Ching H.W., Chung Wai T.M. and Fung K.P. (2005), "Effects of Polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft", *Cancer Biology & Therapy*, 4(11), pp. 1248-54.

135. Lepcha D.L., Chhetri A. and Chhetri D.R. (2019), "Antioxidant and Cytotoxic Attributes of *Paris polyphylla* Smith from Sikkim Himalaya", *Pharmacognosy Journal*, 11(4).

136. Lewicki P.P. (1998), "Effect of pre-drying treatment, drying and rehydration on plant tissue properties: A review", *International Journal of Food Properties*, 1(1), pp. 1-22.

137. Li F.-R., Jiao P., Yao S.-T., Sang H., Qin S.-C., Zhang W., Zhang Y.-B. and Gao L.-L. (2012), "*Paris polyphylla* Smith extract induces apoptosis and activates cancer suppressor gene connexin26 expression", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(1), pp. 205-209.

138. Li J., He L. and Song W. (1993), "Separation and quantitative determination of seven aqueous depsides in *Salvia miltiorrhiza* by HPTLC scanning", *Acta Pharmaceutica Sinica*, 28(7), pp. 543-547.

139. Li Y., Gu J.-F., Zou X., Wu J., Zhang M.-H., Jiang J., Qin D., Zhou J.-Y., Liu B.-X.-Z. and Zhu Y.-T. (2013), "The anti-lung cancer activities of steroidal saponins of *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara through enhanced immunostimulation in experimental Lewis tumor-bearing C57BL/6 mice and induction of apoptosis in the A549 cell line", *Molecules*, 18(10), pp. 12916-12936.

140. Liang B. and Su J. (2015), "Involvement of Renin-Angiotensin System Inhibition, the Potential Risk of Danshen in the Treatment of Pregnancy-Induced Hypertension", *Phytotherapy Research*, 29(9), pp. 1421-1422.

141. Liang W.-H., Chang T.-W. and Charng Y.-C. (2018), "Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of *Angelica dahurica*", *Food Science and Biotechnology*, 27, pp. 1085-1092.

142. Lim Y.Y. and Murtijaya J. (2007), "Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods", *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), pp. 1664-1669.

143. Ling W.C., Liu J., Lau C.W., Murugan D.D., Mustafa M.R. and Huang Y. (2017), "Treatment with salvianolic acid B restores endothelial function in angiotensin II-induced hypertensive mice", *Biochemical pharmacology*, 136, pp. 76-85.

144. Liu M. and Xia X.-H. (2010), "Study on the chemical stability of Tanshinone IIA", *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 33(4), pp. 606-609.

145. Liu Y., Huang Y., Zhao C., Qin X., Zhu Q., Chen S. and Qu J. (2014), "*Salvia miltiorrhiza* injection on pulmonary heart disease: a systematic review and meta-analysis", *The American journal of Chinese medicine*, 42(06), pp. 1315-1331.

146. Liu Z., Wang J., Gao W., Man S., Guo H., Zhang J. and Liu C. (2013), "Formulation and in vitro absorption analysis of Rhizoma paridis steroidal saponins", *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), pp. 680-686.

147. Liu Z., Xu S., Huang X., Wang J., Gao S., Li H., Zhou C., Ye J., Chen S. and Jin Z.G. (2015), "Cryptotanshinone, an orally bioactive herbal compound from Danshen, attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: Role of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)", *British Journal of Pharmacology*, 172(23), pp. 5661-5675.

148. López-Lázaro M. (2015), "A simple and reliable approach for assessing anticancer activity in vitro", *Current Medicinal Chemistry*, 22(11), pp. 1324-1334.

149. Lu B.-L., Li J., Zhou J., Li W.-W. and Wu H.-F. (2016), "Tanshinone IIA decreases the levels of inflammation induced by Aβ1–42 in brain tissues of Alzheimer's disease model rats", *Neuroreport*, 27(12), pp. 883-893.

150. Lü M., Wang T., Tian X., Shi X., Fan G., Zhang Y. and Zhu Y. (2015), "Interaction of anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of commonly used traditional Chinese medicine for promoting blood circulation and removing blood stasis revealed by network pharmacology analysis", *Acta Pharmaceutica Sinica*, 50(9), pp. 1135-1141.

151. Lv T. and Yao X.-X. (2006), "Comparison of protocatechuic aldehyde in Radix *Salvia miltiorrhiza* and corresponding pharmacological sera from normal and fibrotic rats by high performance liquid chromatography", *World Journal of Gastroenterology*, 12(14), pp. 2195.

152. Lv Z. and Xu L.), "Salvianolic Acid B Inhibits ERK and p38 MAPK Signaling in TGF-1-Stimulated Human Hepatic Stellate Cell Line (LX-2) via Distinct Pathways", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

153. Ma D., Lu H., Xu L. and Xiao W. (2009), "Polyphyllin D exerts potent anti-tumour effects on Lewis cancer cells under hypoxic conditions", *Journal of International Medical Research*, 37(3), pp. 631-640.

154. Ma S., Zhang D., Lou H., Sun L. and Ji J. (2016), "Evaluation of the anti-inflammatory activities of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* roots in THP-1 macrophages", *Journal of Ethnopharmacology*, 188, pp. 193-199.

155. Maisnam D., Rasane P., Dey A., Kaur S. and Sarma C. (2017), "Recent advances in conventional drying of foods", *Journal of Food Technology and Preservation*, 1(1).

156. Mayirnao H.S. and Bhat A.A. (2017), "Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Paris polyphylla* Smith", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(11), pp. 315-319.

157. Mehta N., Kumar P., Verma A.K., Umaraw P., Kumar Y., Malav O.P., Sazili A.Q., Domínguez R. and Lorenzo J.M. (2022), "Microencapsulation as a Noble Technique for the Application of Bioactive Compounds in the Food Industry: A Comprehensive Review", *Applied Sciences*, 12(3), pp. 1424.

158. Mei X.-D., Yan-Feng C., Yan-Yun C., Jing L., Shang Z.-P., Wen-Jing Z., Yan-Jiang Q. and Zhang J.-Y. (2019), "Danshen: a phytochemical and pharmacological overview", *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(1), pp. 59-80.

159. Miguel M.G. (2010), "Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review", *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), pp. 291-312.

160. Mostafa A.A., Al-Askar A.A., Almaary K.S., Dawoud T.M., Sholkamy E.N. and Bakri M.M. (2018), "Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), pp. 361-366.

161. Nakauma M., Funami T., Noda S., Ishihara S., Al-Assaf S., Nishinari K. and Phillips G.O. (2008), "Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties", *Food Hydrocolloids*, 22(7), pp. 1254-1267.

162. Nan J.X., Park E.J., Kang H.C., Park P.H., Kim J.Y. and Sohn D.H. (2001), "Anti-fibrotic effects of a hot-water extract from *Salvia miltiorrhiza* roots on liver fibrosis induced by biliary obstruction in rats", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2), pp. 197-204.

163. Nath P.C., Debnath S., Sridhar K., Inbaraj B.S., Nayak P.K. and Sharma M. (2022), "A comprehensive review of food hydrogels: principles, formation mechanisms, microstructure, and its applications", *Gels*, 9(1), pp. 1.

164. Nguyen K.Q., Vuong Q.V., Nguyen M.H. and Roach P.D. (2018), "The effects of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of the Australian maroon bush, *Scaevola spinescens*", *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(10).

165. Nguyen S.T., Do N.M., Vo P.H., Nguyen T.T.T., Truong K.D. and Van Pham P. (2020), "Xao tam phan (*Paramignya trimera*) methanol extract induced apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cell line in vitro", *Science and Technology Development Journal*, 23(1), pp. 484-489.

166. Nguyen S.T., Mai N.T.T., Nhan N.T., Hai N.X., Phan N.K., Dinh K.T. and Van Pham P. (2019), "In vitro apoptosis induction ability of methanolic extract of *Paramignya trimera* root (Xao tam phan) in breast cancer stem cells", *Biomedical Research and Therapy*, 6(8), pp. 3325-3332.

167. Nguyen Thi L.H., Nguyen S.T., Tran T.P., Phan Lu C.N. and Pham P.V. (2018), Anti-cancer effect of Xao Tam Phan (*Paramignya trimera*) methanol root extract on human breast cancer cell line MCF-7 in 3D model, in: *Cancer Biology and Advances in Treatment*Springer. pp. 13-25.

168. Nguyen V.T. (2021), "Antiproliferative capacity of combined extracts from *Paramignya trimera* and *Phyllanthus amarus* against cancer cell lines", *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(2), pp. 471.

169. Nguyen V.T. and Le M.D. (2018), "Influence of various drying conditions on phytochemical compounds and antioxidant activity of carrot peel", *Beverages*, 4(4), pp. 80.

170. Nguyen V.T., Le M.D., Nguyen T.T.T., Khong T.T., Nguyen V.H., Nguyen H.N., Huynh B.N.D., Tran H.T.M. and Trang T.S. (2021), "Microwave-assisted extraction for optimizing saponin yield and antioxidant capacity from cacao pod husk (Theobroma cacao L.)", *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), pp. e15134.

171. Nguyen V.T., Pham N.M.Q., Vuong Q.V., Bowyer M.C., van Altena I.A. and Scarlett C.J. (2016), "Phytochemical retention and antioxidant capacity of xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as prepared by different drying methods", *Drying Technology*, 34(3), pp. 324-334.

172. Nguyen V.T., Sakoff J.A. and Scarlett C.J. (2017), "Physicochemical Properties, Antioxidant and Anti-proliferative Capacities of Dried Leaf and Its Extract from Xao tam phan (*Paramignya trimera*)", *Chemistry & Biodiversity*, 14(6), pp. e1600498.

173. Nguyen V.T., Sakoff J.A. and Scarlett C.J. (2017), "Physicochemical, antioxidant, and cytotoxic properties of Xao Tam Phan (*Paramignya trimera*) root extract and its fractions", *Chemistry & Biodiversity*, 14(4), pp. e1600396.

174. Nguyen V.T., Tran A.X. and Le T.V.A. (2021), "Microencapsulation of phenolic-enriched extract from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.)", *Powder Technology*, 386, pp. 136-143.

175. Nguyen V.T., Tran T.G. and Tran N.L. (2022), "Phytochemical compound yield and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) as influenced by different dehydration conditions", *Drying Technology*, 40(10), pp. 2021-2033.

176. Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C., Van Altena I.A. and Scarlett C.J. (2015), "Effects of different drying methods on bioactive compound yield and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*", *Drying Technology*, 33(8), pp. 1006-1017.

177. Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C., Van Altena I.A. and Scarlett C.J. (2017), "Microwave-assisted extraction for saponins and antioxidant capacity from Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root", *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), pp. e12851.

178. Niwa Y., Kanoh T., Kasama T. and Negishi M. (1988), "Activation of antioxidant activity in natural medicinal products by heating, brewing and lipophilization. A new drug delivery system", *Drugs under experimental and clinical research*, 14(5), pp. 361-372.

179. Noh J., Kim J., Kim J.S., Chung Y.S., Chang S.T. and Park J. (2018), "Microencapsulation by pectin for multi-components carriers bearing both hydrophobic and hydrophilic active agents", *Carbohydrate polymers*, 182, pp. 172-179.

180. Nurdin I., Zulkifli, Satriananda and Nurlaili (2019), "The Study of Gum Arabic as Surfactant on the Stability of Water-based Alumina Nanoparticle Suspensions", IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, IOP Publishing.

181. Ogbulie J., Ogueke C., Okoli I.C. and Anyanwu B.N. (2007), "Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*", *African Journal of Biotechnology*, 6(13).

182. Oliveira M.R., Fürstenau C.R., Souza I.C.C. and F.G. C. (2017), "Tanshinone I attenuates the effects of a challenge with H2O2 on the functions of tricarboxylic acid cycle and respiratory chain in SH-SY5Y cells", *Molecular Neurobiology*, 54, pp. 7858-7868.

183. Ong E.S. and Len S.M. (2004), "Evaluation of pressurized liquid extraction and pressurized hot water extraction for tanshinone I and IIA in *Salvia miltiorrhiza* using LC and LC-ESI-MS", *Journal of Chromatographic Science*, 42(4), pp. 211-216.

184. Orphanides A., Goulas V. and Gekas V. (2013), "Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint", *Czech Journal of Food Sciences*, 31(5), pp. 509-513.

185. Paik Y.-H., Yoon Y.J., Lee H.C., Jung M.K., Kang S.H., Chung S.I., Kim J.K., Cho J.Y., Lee K.S. and Han K.-H. (2011), "Antifibrotic effects of magnesium lithospermate B on hepatic stellate cells and thioacetamide-induced cirrhotic rats", *Experimental & Molecular Medicine*, 43(6), pp. 341-349.

186. Pan X., Niu G. and Liu H. (2001), "Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge with analysis by high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, 922(1-2), pp. 371-375.

187. Pan Y., Fu H., Kong Q., Xiao Y., Shou Q., Chen H., Ke Y. and Chen M. (2014), "Prevention of pulmonary fibrosis with salvianolic acid a by inducing fibroblast cell cycle arrest and promoting apoptosis", *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), pp. 1589-1596.

188. Pan Z., Atungulu G.G. and Li X. (2014), Infrared heating, in: *Emerging technologies for food processing*Elsevier. pp. 461-474.

189. Pang D., Li C., Yang C., Zou Y., Feng B., Li L., Liu W., Geng Y., Luo Q. and Chen Z. (2019), "Polyphyllin VII promotes apoptosis and autophagic cell death via ROS-inhibited AKT activity, and sensitizes glioma cells to temozolomide", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

190. Park C.H., Shin S.H., Lee E.K., Kim D.H., Kim M.J., Roh S.S., Yokozawa T. and Chung H.Y. (2017), "Magnesium Lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge Ameliorates Aging-Induced Renal Inflammation and Senescence via NADPH Oxidase-Mediated Reactive Oxygen Generation", *Phytotherapy Research*, 31(5), pp. 721-728.

191. Park J.H., Park O.K., Yan B., Ji H.A., In H.K., Jae-Chul L. and Seung-Hae K. (2014), "Neuroprotection via maintenance or increase of antioxidants and neurotrophic factors in ischemic gerbil hippocampus treated with tanshinone I", *Chinese Medical Journal*, 127(19), pp. 3396-3405.

192. Payum T. (2018), "Phytocomposition and pharmacological importance of *Paris polyphylla* (Smith) and needs of its conservation in Arunachal Pradesh, India", *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 3(2), pp. 143-150.

193. PB R., Arvind Bharani R., Jini Angel K., Ramachandran M., Priya S. and Rajsekhar V. (2015), "Extraction of *Paris Polyphylla* Rhizome using different solvents and its phytochemical studies", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(1).

194. Pei Y., Zhang Q. and Wang Y. (2020), "Application of authentication evaluation techniques of ethnobotanical medicinal plant genus Paris: a review", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(5), pp. 405-423.

195. Pham H.N.T., Bowyer M.C., van Altena I.A. and Scarlett C.J. (2016), "Influence of solvents and novel extraction methods on bioactive compounds and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*", *Chemical Papers*, 70(5), pp. 556-566.

196. Pham H.N.T., Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C. and Scarlett C.J. (2017), "Bioactive compound yield and antioxidant capacity of *Helicteres hirsuta* Lour. stem as affected by various solvents and drying methods", *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), pp. e12879.

197. Pham H.N.T., Nguyen V.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C. and Scarlett C.J. (2015), "Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaves", *Technologies*, 3(4), pp. 285-301.

198. Pham H.N.T., Sakoff J.A., Bond D.R., Vuong Q.V., Bowyer M.C. and Scarlett C.J. (2018), "In vitro antibacterial and anticancer properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaf and stem extracts and their fractions", *Molecular biology reports*, 45(6), pp. 2125-2133.

199. Pu X., Ren J., Ma X., Liu L., Yu S., Li X. and Li H. (2015), "Polyphylla saponin I has antiviral activity against influenza A virus", *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), pp. 18963.

200. Qin X.J., Ni W., Chen C.X. and Liu H.Y. (2018), "Seeing the light: Shifting from wild rhizomes to extraction of active ingredients from above-ground parts of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Journal of Ethnopharmacology*, 224, pp. 134-139.

201. Qin X.J., Sun D.J., Ni W., Chen C.X., Hua Y., He L. and Liu H.Y. (2012), "Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Steroids*, 77(12), pp. 1242-1248.

202. Rabeta M. and Vithyia M. (2013), "Effect of different drying methods on the antioxidant properties of *Vitex negundo* Linn. tea", *International Food Research Journal*, 20(6), pp. 3171.

203. Radünz M., Hackbart H.C.d.S., Camargo T.M., Raphaelli C.d.O., Radünz A.L., Gandra E.A. and Zavareze E.d.R. (2025), "Encapsulation of *Beta vulgaris* extract by electrospraying and evaluation of antimicrobial potential", *Revista Ceres*, 72, pp. e72028.

204. Ran X., Zhao W., Li W., Shi J. and Chen X. (2016), "Cryptotanshinone inhibits TNF-α-induced LOX-1 expression by suppressing reactive oxygen species (ROS) formation in endothelial cells", *The Korean journal of physiology & pharmacology*, 20(4), pp. 347.

205. Raoufi S., Baluchnejadmojarad T., Roghani M., Ghazanfari T., Khojasteh F. and Mansouri M. (2015), "Antidiabetic potential of salvianolic acid B in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes", *Pharmaceutical Biology*, 53(12), pp. 1803-1809.

206. Ren Y., Chen Y., Hu B., Wu H., Lai F. and Li X. (2015), "Microwave-assisted extraction and a new determination method for total steroid saponins from Dioscorea zingiberensis CH Wright", *Steroids*, 104, pp. 145-152.

207. Ribeiro A.M., Shahgol M., Estevinho B.N. and Rocha F. (2020), "Microencapsulation of Vitamin A by spray-drying, using binary and ternary blends of gum arabic, starch and maltodextrin", *Food Hydrocolloids*, 108, pp. 106029.

208. Rocha R.P., Melo E.C. and Radünz L.L. (2011), "Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), pp. 7076-7084.

209. Roy A., Ahuja S. and Bharadvaja N. (2017), "A review on medicinal plants against cancer", *Journal of Plant Sciences and Agricultural Research*, 2, pp. 1008.

210. Ruamrungsri N., Siengdee P., Sringarm K., Chomdej S., Ongchai S. and Nganvongpanit K. (2016), "In vitro cytotoxic screening of 31 crude extracts of Thai herbs on a chondrosarcoma cell line and primary chondrocytes and apoptotic effects of selected extracts", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52, pp. 434-444.

211. Salazar-Aguilar S., Ruiz-Posadas L.d.M., Cadena-Iñiguez J., Soto-Hernández M., Santiago-Osorio E., Aguiñiga-Sánchez I., Cisneros-Solano V.M., Aguirre-Medina J.F. and Olivera Á.D. (2021), "Microencapsulation of an extract of *Sechium edule* (Jacq.) Sw., with antineoplastic activity", *Applied Sciences*, 12(1), pp. 24.

212. Santos F.F., Rodrigues S. and Fernandes F.A. (2009), "Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis", *Fuel processing technology*, 90(2), pp. 312-316.

213. Sapkota R., Dasgupta R. and Rawat D. (2012), "Antibacterial effects of plants extracts on human microbial pathogens & microbial limit tests", *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2(4), pp. 926-936.

214. Sawah E.A., Marchion D.C., Xiong Y., Ramirez I.J., Abbasi F., Boac B.M., Bush S.H., Zgheib N.B., McClung E.C. and Khulpateea B.R. (2015), "The Chinese herb Polyphyllin D sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced growth arrest", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141, pp. 237-242.

215. Sayem A., Ahmed T., Mithun M.U.K., Rashid M. and Rana M.R. (2024), "Optimising ultrasound-assisted extraction conditions for maximising phenolic, flavonoid content and antioxidant activity in hog plum peel and seed: A response surface methodology approach", *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, pp. 101312.

216. Scarlett C.J. (2019), "Cytotoxic activity of extracts and fractions from *Paramignya trimera* root and *Phyllanthus amarus* against pancreatic cancer cell lines", *Journal of Cancer research and Therapeutics*, 15(1), pp. 245.

217. Sferra R., Vetuschi A., Catitti V., Ammanniti S., Pompili S., Melideo D., Frieri G., Gaudio E. and Latella G. (2012), "*Boswellia serrata* and *Salvia miltiorrhiza* extracts reduce DMN-induced hepatic fibrosis in mice by TGF-β1 downregulation", *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 16(11).

218. Sha A. and Li Y. (2025), "Preparation, structural characterization, bioactivities, and potential clinical applications of the polysaccharides from Paris polyphylla: a review", *Frontiers in Pharmacology*, 16, pp. 1539237.

219. Shah S.A., Mazumder P.B. and Choudhury M.D. (2012), "Medicinal properties of *Paris polyphylla* Smith: a review", *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 6(1), pp. 27-33.

220. Shamsa F., Monsef H., Ghamooshi R. and Verdian-rizi M. (2008), "Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants", *Journal of Applied Horticulture*, 12(1), pp. 69-70.

221. Shan F., Yang L., Peng Y., Kang X. and Ma Y. (2010), "Study on the antifertility effect of the saponins in Rhizoma Paridis Yunnanensis [Rhizoma from *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) Hand.-Mazz.] *in vitro*", *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 27, pp. 961-963.

222. Shen S., Chen D., Li X., Li T., Yuan M., Zhou Y. and Ding C. (2014), "Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*", *Carbohydrate Polymers*, 104, pp. 80-86.

223. Shi Z., He J., Yao T., Chang W. and Zhao M. (2005), "Simultaneous determination of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone IIA in traditional Chinese medicinal preparations containing Radix *Salvia miltiorrhiza* by HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(3), pp. 481-486.

224. Shishir M.R.I., Xie L., Sun C., Zheng X. and Chen W. (2018), "Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters", *Trends in Food Science & Technology*, 78, pp. 34-60.

225. Shraim A.M., Ahmed T.A., Rahman M.M. and Hijji Y.M. (2021), "Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation", *Lwt*, 150, pp. 111932.

226. Shu M., Hu X.R., Hung Z.A., Huang D.D. and Zhang S. (2016), "Effects of tanshinone IIA on fibrosis in a rat model of cirrhosis through heme oxygenase-1, inflammation, oxidative stress and apoptosis", *Molecular medicine reports*, 13(4), pp. 3036-3042.

227. Singleton V.L. and Rossi J.A. (1965), "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), pp. 144-158.

228. Song Y., Gu Y., Ren A., Li X., Wu S., Gong Y. and Luo Y. (2025), "Optimization and comprehensive characterization of the microencapsulation process for taro essence", *Foods*, 14(5), pp. 754.

229. Sontakke M.S. and Salve S.P. (2015), "Solar drying technologies: A review", *International Refereed Journal of Engineering and Science*, 4(4), pp. 29-35.

230. Stopic S., Wenz F., Husovic T.-V. and Friedrich B. (2021), "Synthesis of silica particles using ultrasonic spray pyrolysis method", *Metals*, 11(3), pp. 463.

231. Šturm L., Črnivec I.G.O., Istenič K., Ota A., Megušar P., Slukan A., Humar M., Levic S., Nedović V. and Deželak M. (2019), "Encapsulation of non-dewaxed propolis by freeze-drying and spray-drying using gum Arabic, maltodextrin and inulin as coating materials", *Food and Bioproducts Processing*, 116, pp. 196-211.

232. Sun M., Ni L., Huang Y., Yang M., Cheng G., Zhang M., Wu M. and Ma C. (2023), "Effects of different drying treatments on the microstructure, free amino acids, volatile compounds and antioxidant activity of *Flammulina velutipes* root", *Food Chemistry: X*, 18, pp. 100656.

233. Sung H.J., Choi S.M., Yoon Y. and An K.S. (1999), "Tanshinone IIA, an ingredient of S*alvia miltiorrhiza* BUNGE, induces apoptosis in human leukemia cell lines through the activation of caspase-3", *Experimental & Molecular Medicine*, 31(4), pp. 174-178.

234. Tan P., Tan C. and Ho C. (2011), "Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (Centella asiatica)", *International Food Research Journal*, 18(2).

235. Tang J., Feng H. and Lau M. (2002), "Microwave heating in food processing", *Advances in Bioprocessing Engineering*, 1, pp. 1-43.

236. Tang S., Shen X.-Y., Huang H.-Q., Xu S.-W., Yu Y., Zhou C.-H., Chen S.-R., Le K., Wang Y.-H. and Liu P.-Q. (2011), "Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW264. 7 macrophages through inhibition of the NF-κB and MAPK signaling pathways", *Inflammation*, 34, pp. 111-118.

237. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. and Byrne D.H. (2006), "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts", *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), pp. 669-675.

238. Thamkaew G., Sjöholm I. and Galindo F.G. (2021), "A review of drying methods for improving the quality of dried herbs", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(11), pp. 1763-1786.

239. Thi T.N. and Tai H.P. (2023), "Microwave assisted extraction of custard apple (*Annona squamosal* L.) peel", *Carpathian Journal of Food science and Technology*, 15(1), pp. 220-231.

240. Thu T.T.M. and Krasaekoopt W. (2016), "Encapsulation of protease from Aspergillus oryzae and lipase from Thermomyces lanuginoseus using alginate and different copolymer types", *Agriculture and Natural Resources*, 50(3), pp. 155-161.

241. Tian Y., Gong G.-Y., Ma L.-L., Wang Z.-Q., Song D. and Fang M.-Y. (2020), "Anti-cancer effects of Polyphyllin I: An update in 5 years", *Chemico-Biological Interactions*, 316, pp. 108936.

242. Tolun A., Altintas Z. and Artik N. (2016), "Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization", *Journal of biotechnology*, 239, pp. 23-33.

243. Tonon R.V., Brabet C. and Hubinger M.D. (2008), "Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (Euterpe oleraceae Mart.) powder produced by spray drying", *Journal of food engineering*, 88(3), pp. 411-418.

244. Tran P.T.T. and Nguyen V.T. (2024), "Characterization of microencapsulated powders rich in saponins from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) and medicinal plant an xoa (*Helicteres hirsuta* Lour.)", *Heliyon*, 10(11).

245. Tran T.M.K., Kirkman T., Nguyen M. and Van Vuong Q. (2020), "Effects of drying on physical properties, phenolic compounds and antioxidant capacity of Robusta wet coffee pulp (*Coffea canephora*)", *Heliyon*, 6(7).

246. Trusheva B., Trunkova D. and Bankova V. (2007), "Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study", *Chemistry Central Journal*, 1, pp. 1-4.

247. Uribe E., Pardo-Orellana C., Vega-Gálvez A., Ah-Hen K., Pastén A., García V. and Aubourg S.P. (2020), "Effect of drying methods on bioactive compounds, nutritional, antioxidant, and antidiabetic potential of brown alga *Durvillaea antarctica*", *Drying Technology*, 38(14), pp. 1915-1928.

248. Uribe E., Vega-Gálvez A., García V., Pastén A., Rodríguez K., López J. and Scala K.D. (2020), "Evaluation of physicochemical composition and bioactivity of a red seaweed (*Pyropia orbicularis*) as affected by different drying technologies", *Drying Technology*, 38(9), pp. 1218-1230.

249. Utami P.D., Setianingsih H. and Tirto Sari D.R. (2024), "Microencapsulation, Physicochemical Characterization, and Antioxidant, Antibacterial, and Antiplasmodial Activities of *Holothuria atra* Microcapsule", *Scientifica*, 2024(1), pp. 5559133.

250. Valentina V., Pratiwi R.A., Hsiao P., Tseng H., Hsieh J. and Chen C. (2016), "Sensorial characterization of foods before and after freeze-drying", *Sensorial Characterization of Foods Before and After Freeze-drying*, 1(6), pp. 1-5.

251. Vu H.T., Scarlett C.J. and Vuong Q.V. (2017), "Effects of drying conditions on physicochemical and antioxidant properties of banana (*Musa cavendish*) peels", *Drying Technology*, 35(9), pp. 1141-1151.

252. Wang C., Zhao R., Li B., Gu L. and Gou H. (2016), "An *in vivo* and *in vitro* study: high-dosage Danshen injection induces peripheral vascular endothelial cells injury", *Human & Experimental Toxicology*, 35(4), pp. 404-417.

253. Wang J., Liu R., Xiao H., Bi H. and Li Z. (2010), "The effects of Paridis saponin II on the production of cell cytokines in CD4+ CD25+ T regulation cells from lupus nephritis patients' peripheral blood", *Progress in Modern Biomedicine*, 10(1), pp. 50-53.

254. Wang J., Lu W., Wang W., Zhang N., Wu H., Liu C., Chen X., Chen Y., Chen Y. and Jiang Q. (2013), "Promising therapeutic effects of sodium tanshinone IIA sulfonate towards pulmonary arterial hypertension in patients", *Journal of Thoracic Disease*, 5(2), pp. 169.

255. Wang W., Guan C., Sun X., Zhao Z., Li J., Fu X., Qiu Y., Huang M., Jin J. and Huang Z. (2016), "Tanshinone IIA protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating the Nrf2 pathway", *Phytomedicine*, 23(6), pp. 589-596.

256. Wang W., Liu Y., Sun M., Sai N., You L., Dong X., Yin X. and Ni J. (2019), "Hepatocellular toxicity of paris saponins I, II, VI and VII on two kinds of hepatocytes-HL-7702 and HepaRG cells, and the underlying mechanisms", *Cells*, 8(7), pp. 690.

257. Wang X., Wang C., Zhang L., Li Y., Wang S., Wang J., Yuan C., Niu J., Wang C. and Lu G. (2015), "Salvianolic acid A shows selective cytotoxicity against multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells", *Anti-cancer Drugs*, 26(2), pp. 210-223.

258. Wang Y., Cao S.-H., Cui Y.-J., Kong L.-K., Tian H., Cai H.-X., Wu Y.-P., Han J.-J., Zhao X.-M. and Xia Z.-L. (2015), "*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba ameliorates the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by protecting endothelial injury in rats", *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 236(2), pp. 155-162.

259. Wang Y., Gao W., Liu X., Zuo Y., Chen H. and Duan H. (2006), "Anti-tumor constituents from *Paris polyphylla*", *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1, pp. 7-10.

260. Wang Y., Zhao W., Li Y., Zhao H., Ye X., Li T., Wang Z. and Huang L. (2022), "Optimization of ultrasound-assisted extraction method for phytochemical compounds and antioxidant activities of sour jujube extracts", *Food Science & Nutrition*, 10(11), pp. 3736-3748.

261. Wang Z.-s., Luo P., Dai S.-h., Liu Z.-b., Zheng X.-r. and Chen T. (2013), "Salvianolic acid B induces apoptosis in human glioma U87 cells through p38-mediated ROS generation", *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33, pp. 921-928.

262. Widowati W., Mozef T., Risdian C., Ratnawati H., Tjahyani S. and Sandra F. (2010), "Apoptosis and Antioxidant Activities of *Catharanthus rosues* [L] G. Don Extract on Breast Cancer Cell Line", *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 1(2), pp. 99-107.

263. Wojdyło A., Figiel A., Lech K., Nowicka P. and Oszmiański J. (2014), "Effect of convective and vacuum–microwave drying on the bioactive compounds, color, and antioxidant capacity of sour cherries", *Food and Bioprocess Technology*, 7, pp. 829-841.

264. Wojdyło A., Figiel A. and Oszmianski J. (2009), "Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), pp. 1337-1343.

265. Wu C.-F., Bohnert S., Thines E. and Efferth T. (2016), "Cytotoxicity of *Salvia miltiorrhiza* against multidrug-resistant cancer cells", *The American Journal of Chinese Medicine*, 44(04), pp. 871-894.

266. Wu X., Wang L., Wang G.-C., Wang H., Dai Y., Yang X.-X., Ye W.-C. and Li Y.-L. (2013), "Triterpenoid saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Carbohydrate Research*, 368, pp. 1-7.

267. Wu X., Wang L., Wang H., Dai Y., Ye W.-C. and Li Y.-L. (2012), "Steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Phytochemistry*, 81, pp. 133-143.

268. Wu Y.-J., Hong C.-Y., Lin S.-J., Wu P. and Shiao M.-S. (1998), "Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of Salvia miltiorrhiza", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18(3), pp. 481-486.

269. Xiao T., Zhong W., Zhao J., Qian B., Liu H., Chen S., Qiao K., Lei Y., Zong S. and Wang H. (2018), "Polyphyllin I suppresses the formation of vasculogenic mimicry via Twist1/VE-cadherin pathway", *Cell Death & Disease*, 9(9), pp. 906.

270. Xiao X., Bai P., Bui Nguyen T.M., Xiao J., Liu S., Yang G., Hu L., Chen X., Zhang X. and Liu J. (2009), "The antitumoral effect of Paris Saponin I associated with the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway", *Molecular cancer therapeutics*, 8(5), pp. 1179-1188.

271. Xiaomei L., Yunan J., Ling M. and Lili D. (2015), "Danshen (Radix *Salviae Miltiorrhizae*) reverses renal injury induced by myocardial infarction", *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35(3), pp. 306-311.

272. Xie L.X., Durairajan S.S.K., Lu J.H., Liu C.L., Kum W.F., Wang Y., Koo I., Wu W.K., Han D. and Lao F. (2010), "The effect of salvianolic acid B combined with laminar shear stress on TNF-α-stimulated adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells", *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(4), pp. 245-258.

273. Xu L., Shen P., Bi Y., Chen J., Xiao Z., Zhang X. and Wang Z. (2016), "Danshen injection ameliorates STZ-induced diabetic nephropathy in association with suppression of oxidative stress, pro-inflammatory factors and fibrosis", *International Immunopharmacology*, 38, pp. 385-394.

274. Xu M., Cao F.-l., Zhang Y.-f., Shan L., Jiang X.-l., An X.-j., Xu W., Liu X.-z. and Wang X.-y. (2015), "Tanshinone IIA therapeutically reduces LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and apoptosis in mice", *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(2), pp. 179-187.

275. Xu S., Zhong A., Bu X., Ma H., Li W., Xu X. and Zhang J. (2015), "Salvianolic acid B inhibits platelets-mediated inflammatory response in vascular endothelial cells", *Thrombosis research*, 135(1), pp. 137-145.

276. Xu Y., Zhang M., Mujumdar A.S., Duan X. and Jin-cai S. (2006), "A two-stage vacuum freeze and convective air drying method for strawberries", *Drying Technology*, 24(8), pp. 1019-1023.

277. Yang C., Cai H. and Meng X. (2016), "Polyphyllin D induces apoptosis and differentiation in K562 human leukemia cells", *International Immunopharmacology*, 36, pp. 17-22.

278. Yang J.X., Pan Y.Y., Ge J.H., Chen B., Mao W., Qiu Y.G. and Wang X.X. (2016), "Tanshinone II A attenuates TNF-α-induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 in endothelial progenitor cells by blocking activation of NF-κB", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1-2), pp. 195-206.

279. Yang R., Qi J., Zhang J., Wang F. and Fan L. (2015), "Effects of Paris polyphylla saponin VII plus silica nano composite on ovarian cancer drug resistance in vitro", *Zhonghua yi xue za zhi*, 95(23), pp. 1859-1861.

280. Yang S.-J., Woo K.-S., Yoo J.-S., Kang T.-S., Noh Y.-H., Lee J.-S. and Jeong H.-S. (2006), "Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment", *Korean Journal of Food Science and Technology*, 38(4), pp. 521-525.

281. Yang X.y., Sun L., Xu P., Gong L.l., Qiang G.f., Zhang L. and Du G.h. (2011), "Effects of salvianolic acid A on plantar microcirculation and peripheral nerve function in diabetic rats", *European Journal of Pharmacology*, 665(1-3), pp. 40-46.

282. Yin D., Yin J., Yang Y., Chen S. and Gao X. (2014), "Renoprotection of Danshen Injection on streptozotocin-induced diabetic rats, associated with tubular function and structure", *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), pp. 667-674.

283. Yu J., Wang X., Li Y. and Tang B. (2017), "Tanshinone IIA suppresses gastric cancer cell proliferation and migration by downregulation of FOXM1", *Oncology Reports*, 37(3), pp. 1394-1400.

284. Yu Q., Li Q., Lu P. and Chen Q. (2014), "Polyphyllin D induces apoptosis in U87 human glioma cells through the c-Jun NH2-terminal kinase pathway", *Journal of Medicinal Food*, 17(9), pp. 1036-1042.

285. Yue T., Xing Y., Xu Q., Yang S., Xu L., Wang X. and Yang P. (2021), "Physical and chemical properties of purple cabbage as affected by drying conditions", *International Journal of Food Properties*, 24(1), pp. 997-1010.

286. Yun H., Lijian C., Wenhong Z., Yuhong D., Yongli W., Qiang W. and Ding Z. (2007), "Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines in vitro from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. chinensis", *Chemistry of Natural Compounds*, 43, pp. 672-677.

287. Zabot G.L., Schaefer Rodrigues F., Polano Ody L., Vinícius Tres M., Herrera E., Palacin H., Córdova-Ramos J.S., Best I. and Olivera-Montenegro L. (2022), "Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications", *Polymers*, 14(19), pp. 4194.

288. Zahara I.A., Ulfa S.M. and Safitri A. (2024), "Comparative Analysis of Different Natural Polymers as Coating Agents for Freeze-Dried Microencapsulation of *Cosmos caudatus* Kunth Compounds", *The Scientific World Journal*, 2024(1), pp. 6833341.

289. Zhang H.-S., Zhang F.-J., Li H., Liu Y., Du G.-Y. and Huang Y.-H. (2016), "Tanshinone IIA inhibits human esophageal cancer cell growth through miR-122-mediated PKM2 down-regulation", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 598, pp. 50-56.

290. Zhang J., An S.J., Fu J.Q., Liu P., Shao T.M., Li M., Li X., Jiao Z. and Chai X.Q. (2016), "Mixed aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* reduces blood pressure through inhibition of vascular remodelling and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1-2), pp. 347-360.

291. Zhang J.Y., Wang Y.Z., Zhao Y.L., Yang S.B., Zuo Z.T., Yang M.Q., Zhang J., Yang W.Z., Yang T.M. and Jin H. (2011), "Phytochemicals and bioactivities of Paris species", *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(7), pp. 670-681.

292. Zhang K.Q., Bao Y., Wu P., Rosen R.T. and Ho C.T. (1990), "Antioxidative components of tanshen (*Salvia miltiorhiza* Bung)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), pp. 1194-1197.

293. Zhang M., Li X., Jiu G. and Liu Y. (2003), "Effect of danshen injection on expression of platelet membrane glycoproteins in patients with type II diabetes mellitus", *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 26(10), pp. 738-740.

294. Zhang S. (2023), "Recent advances of polyphenol oxidases in plants", *Molecules*, 28(5), pp. 2158.

295. Zhang S.Q., Zhang J.S. and Wang C.Z. (2007), "Extraction of steroid saponins from *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* using novel ultrahigh pressure extraction technology", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(8), pp. 27-31.

296. Zhang T., Liu H., Liu X.T., Xu D.R., Chen X.Q. and Wang Q. (2010), "Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(1), pp. 114-24.

297. Zhang W., Zhang D., Ma X., Liu Z., Li F. and Wu D. (2014), "Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer Hela cells", *European Journal of Medical Research*, 19(1), pp. 1-7.

298. Zhang X., Wu J., Qin L., Wang G., Li P., Yu A., Liu A. and Sun R. (2022), "Separation and Purification of Two Saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by a Macroporous Resin", *Molecules*, 27(19).

299. Zhang Y., Zhang Y., Xie Y., Gao Y., Ma J., Yuan J., Li J., Wang J., Li L. and Zhang J. (2013), "Multitargeted inhibition of hepatic fibrosis in chronic iron-overloaded mice by *Salvia miltiorrhiza*", *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), pp. 671-681.

300. Zhao W., Wu C. and Chen X. (2016), "Cryptotanshinone inhibits oxidized LDL-induced adhesion molecule expression via ROS dependent NF-κB pathways", *Cell Adhesion & Migration*, 10(3), pp. 248-258.

301. Zhao Y., Kang L.P., Liu Y.X., Liang Y.G., Tan D.W., Yu Z.Y., Cong Y.W. and Ma B.P. (2009), "Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities", *Planta Medica*, 75(04), pp. 356-363.

302. Zhou L., Zuo Z. and Chow M.S.S. (2005), "Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use", *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(12), pp. 1345-1359.

303. Zhou T., Luo C.-M., Zhang S.-L., Huang Z.-F., Tang Y.-N., Liu Y.-H., Chen Y., Li Q. and Yi J. (2019), "Study on dynamic changes of chemical constituents during different drying processes of *Salvia miltiorrhiza*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 44(21), pp. 4634-4640.

304. Zhu L., Tan J., Wang B., Guan L., Liu Y. and Zheng C. (2011), "*In-vitro* antitumor activity and antifungal activity of pennogenin steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(2), pp. 279.

305. Zhu Z., He J., Liu G., Barba F.J., Koubaa M., Ding L., Bals O., Grimi N. and Vorobiev E. (2016), "Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, pp. 1-9.

306. Zolgharnein J., Shahmoradi A. and Ghasemi J.B. (2013), "Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves", *Journal of Chemometrics*, 27(1-2), pp. 12-20.

PHỤ LỤC

PL1. Kết quả định danh 2 cây dược liệu II
PL2. Kết quả xử lý số liệu nghiên cứu sấy VI
PL3. Bố trí thí nghiệm và kết quả tối ưu hóa theo mô…. hình Box-Behnken X
PL4. Hình ảnh kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật XII
PL5. Kết quả kiểm tra vi sinh vật và kim loại nặng của bột vi bao XIV
PL6. Phương trình đường chuẩn..... XX

PL1. Kết quả định danh 2 cây dược liệu

ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
VIỆN NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
PHÒNG THÍ NGHIỆM BỆNH HỌC VÀ CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ
---oOo---

KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

THÔNG TIN VỀ MẪU THỬ	
Người gửi mẫu	Trần Thanh Giang
Nơi gởi mẫu	Trường Đại học Nha Trang
Mẫu thử	2 mẫu dược liệu
Yêu cầu	Định danh loài

PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

Thực hiện ly trích DNA tổng số bằng phương pháp CTAB của (Mitja Križmandna và Ctv,2006).

Thực hiện phản ứng PCR sử dụng DreamTaq PCR Master Mix – Thermo với cặp mồi COX và gửi mẫu GTT

Trình tự Primer: COX F3: 5' TAT GGG AGC CGT TTT TGC 3
COX B3: 5' ACT GCT AAG TGC ATT CC 3'



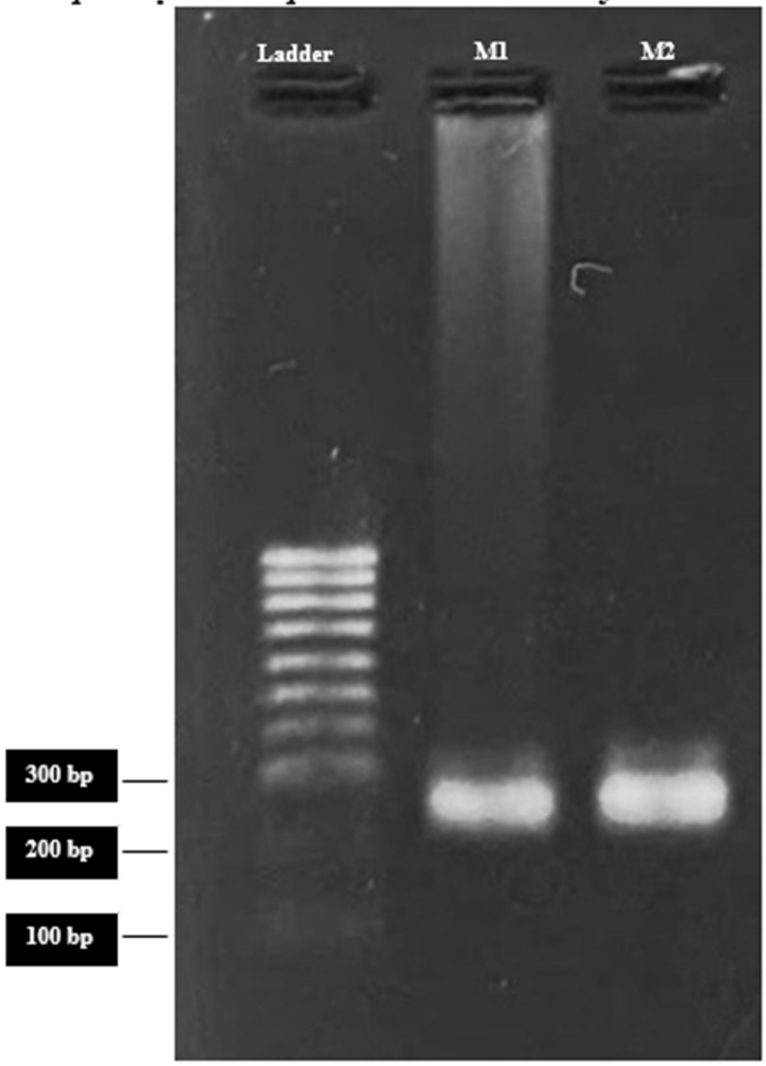
M1: BH



M2: ĐS

KẾT QUẢ

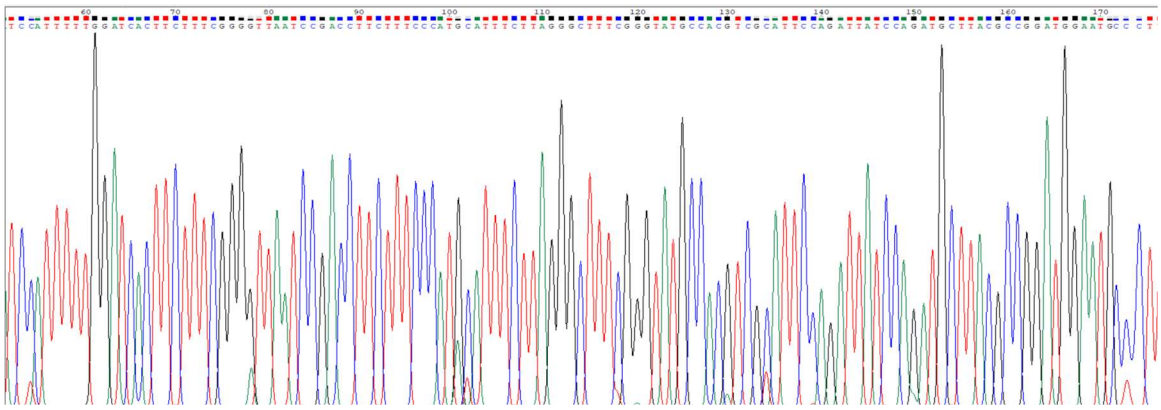
Kết quả điện di sản phẩm PCR của DNA ly trích từ các mẫu.



M : Ladder 1Kb
M1: Mẫu BH
M2: Mẫu ĐS

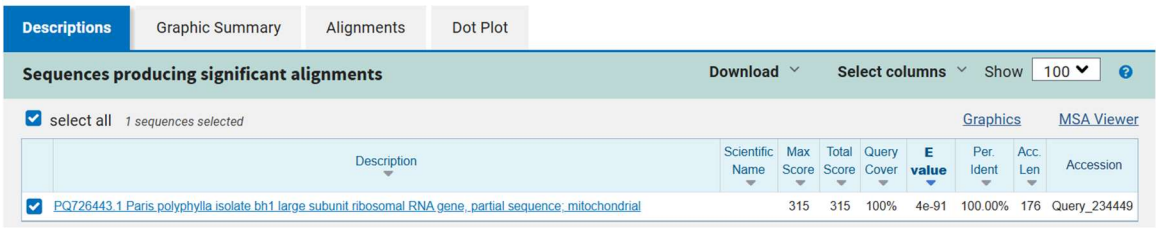
Kết quả GTT

Mẫu M1- COX F3



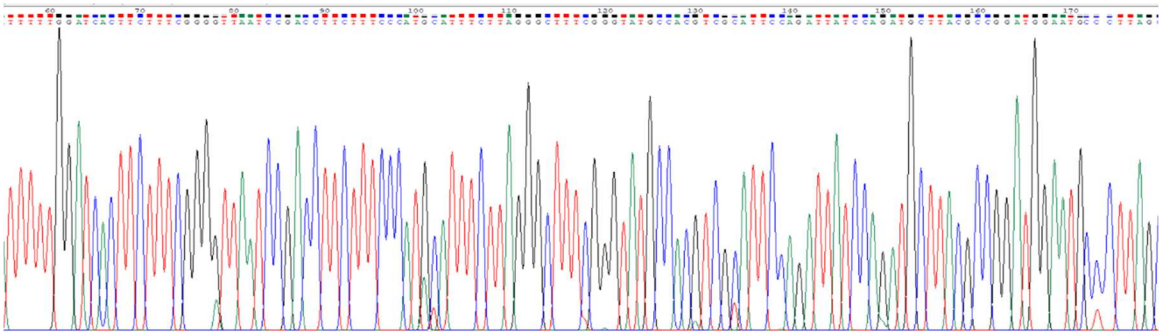
>1st_BASE_5293199_BH_COX_F3

GGTGNGTNNTCTTTGGTCGGACATACCCTGAAACTTTAGGTCAAATCCATTTTTGGATCACTTCTTTCGGGGTTAATCCGACCTTCTTTCCCATGCATTTCTTAGGGCTTTCGGGTATGCCACGTCGCATTCCAGATTATCCAGATGCTTACGCCGGATGGAATGCCCTTAGCAGT



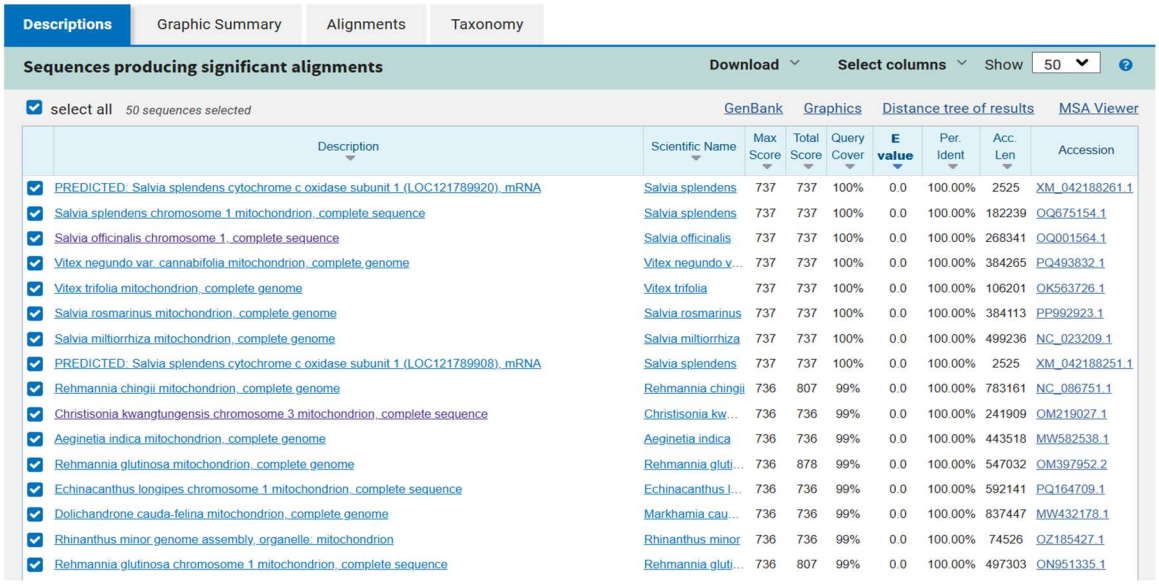
Kết luận: Kết quả giải trình tự cho thấy chất lượng các peak tốt. Đối chiếu với liệu của GenBank (NCBI) cho kết quả là loài *Paris polyphylla* phần trăm tương đồng 100%. Vẽ cây phân nhánh di truyền phân tích mối quan hệ các loài, kết quả mẫu BH cùng nhóm với loài *Paris polyphylla* với độ tương đồng 99%.

Mẫu M2 – COX F3



>1st_BASE_5293200_ĐS_COX_F3

TATAGCTGTCCCCACTGGAATCAAAATCTTTAGTTGGATCGCTACCATGT
GGGGGGGTTCGATACAATACAAAACACCCATGTTATTTGCTGTAGGGTT
CATCTTTTTGTTCACCATAGGAGGACTCACGGGAATAGTTCTGGCAAATT
CTGGGCTAGACATTGCTCTACATGATACTTATTATGTGGTTGCACATTTC
CATTATGTACTTTCTATGGGAGCCGTTTTTGCTTTATTTGCAGGATTTCAC
TATTGGGTAGGTAAAATCTTTGGTCGGACATACCCTGAAACTTTAGGTCA
AATCCATTTTTGGATCACTTTTTTCGGGGTTAATCTGACCTTCTTTCCTAT
GCATTTCTTAGGGCTTTCGGGTATGCCACGTCGCATTCCAGATTATCC



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

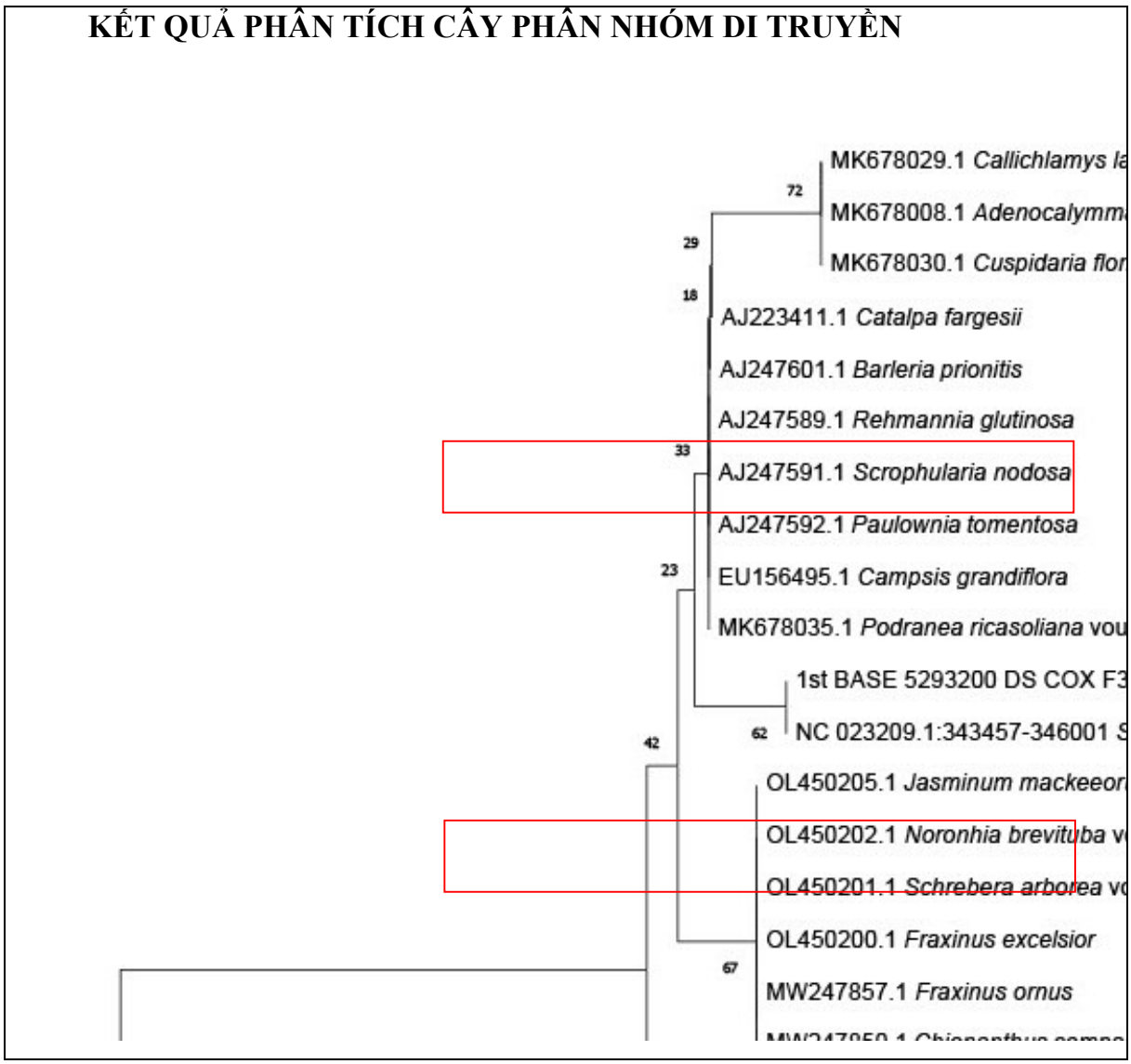
Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 50

select all *50 sequences selected* — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: Salvia splendens cytochrome c oxidase subunit 1 (LOC121789920), mRNA	Salvia splendens	737	737	100%	0.0	100.00%	2525	XM_042188261.1
Salvia splendens chromosome 1 mitochondrion, complete sequence	Salvia splendens	737	737	100%	0.0	100.00%	182239	OQ675154.1
Salvia officinalis chromosome 1, complete sequence	Salvia officinalis	737	737	100%	0.0	100.00%	268341	OQ001564.1
Vitex negundo var. cannabifolia mitochondrion, complete genome	Vitex negundo v…	737	737	100%	0.0	100.00%	384265	PQ493832.1
Vitex trifolia mitochondrion, complete genome	Vitex trifolia	737	737	100%	0.0	100.00%	106201	OK563726.1
Salvia rosmarinus mitochondrion, complete genome	Salvia rosmarinus	737	737	100%	0.0	100.00%	384113	PP992923.1
Salvia miltiorrhiza mitochondrion, complete genome	Salvia miltiorrhiza	737	737	100%	0.0	100.00%	499236	NC_023209.1
PREDICTED: Salvia splendens cytochrome c oxidase subunit 1 (LOC121789908), mRNA	Salvia splendens	737	737	100%	0.0	100.00%	2525	XM_042188251.1
Rehmannia chingii mitochondrion, complete genome	Rehmannia chingii	736	807	99%	0.0	100.00%	783161	NC_086751.1
Christisonia kwangtungensis chromosome 3 mitochondrion, complete sequence	Christisonia kw…	736	736	99%	0.0	100.00%	241909	OM219027.1
Aeginetia indica mitochondrion, complete genome	Aeginetia indica	736	736	99%	0.0	100.00%	443518	MW582538.1
Rehmannia glutinosa mitochondrion, complete genome	Rehmannia gluti…	736	878	99%	0.0	100.00%	547032	OM397952.2
Echinacanthus longipes chromosome 1 mitochondrion, complete sequence	Echinacanthus l…	736	736	99%	0.0	100.00%	592141	PQ164709.1
Dolichandrone cauda-felina mitochondrion, complete genome	Markhamia cau…	736	736	99%	0.0	100.00%	837447	MW432178.1
Rhinanthus minor genome assembly, organelle: mitochondrion	Rhinanthus minor	736	736	99%	0.0	100.00%	74526	OZ185427.1
Rehmannia glutinosa chromosome 1 mitochondrion, complete sequence	Rehmannia gluti…	736	807	99%	0.0	100.00%	497303	ON951335.1

Kết luận: Kết quả giải trình tự cho thấy chất lượng các peak tốt. Đối chiếu với dữ liệu của GenBank (NCBI) cho kết quả tạp lẫn nhiều loài và phần trăm tương đồng tương đối khoảng 100%. Vẽ cây phân nhánh di truyền phân tích mối quan hệ các trình tự sau BLAST, kết quả mẫu ĐS cùng nhóm với loài *Salvia miltiorrhiza* với độ tương đồng 62%.

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÂY PHÂN NHÓM DI TRUYỀN



PL2. Kết quả xử lý số liệu nghiên cứu sấy

PL2.1. Kết quả xử lý số liệu nghiên cứu sấy rễ ĐS

SC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	18	3	12.8857					
	111	3		16.6827				
	19	3		18.0087	18.0087			
	15	3		19.1677	19.1677			
	113	3		19.2800	19.2800			
	16	3		19.5970	19.5970			
	11	3			20.6830			
	12	3			21.2660			
	112	3			21.3370			
	13	3				24.8507		
	14	3				26.9950		
	17	3				27.2163		
	110	3					32.0040	
	114	3					33.6637	
	115	3						48.7563
	Sig.		1.000	.107	.074	.166	.300	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TPC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Duncan[a]	15	3	2.8707									
	11	3	2.9750									
	111	3	3.0890	3.0890								
	16	3	3.5173	3.5173	3.5173							
	112	3	3.7840	3.7840	3.7840	3.7840						
	113	3	3.8780	3.8780	3.8780	3.8780						
	12	3		4.2770	4.2770	4.2770						
	17	3			4.6697	4.6697	4.6697					
	18	3				4.9773	4.9773					
	13	3					5.7300					
	14	3						8.1567				
	110	3							9.3613			
	19	3								13.0480		
	114	3									16.6827	
	115	3										21.2370
	Sig.		.110	.056	.064	.055	.072	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TFC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	15	3	.3703					
	111	3	.4007	.4007				
	112	3	.4413	.4413				
	14	3	.5223	.5223	.5223			
	113	3	.5717	.5717	.5717			
	16	3	.5790	.5790	.5790			
	12	3	.5840	.5840	.5840			
	18	3		.6810	.6810			
	13	3		.6833	.6833			
	11	3			.7467			
	110	3				1.2567		
	17	3					1.8617	
	19	3					1.9887	
	115	3					2.0420	
	114	3						2.3713
	Sig.		.157	.065	.137	1.000	.193	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TAC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	12	3	3.3723								
	13	3	3.6143	3.6143							
	11	3	3.9517	3.9517							
	14	3	4.2163	4.2163	4.2163						
	15	3	4.3340	4.3340	4.3340	4.3340					
	111	3		4.5173	4.5173	4.5173					
	16	3			5.2080	5.2080					
	112	3			5.2220	5.2220					
	17	3				5.3680					
	113	3					6.5773				
	18	3						11.6263			
	19	3						12.2050	12.2050		
	110	3							13.1637		
	114	3								16.5163	
	115	3									26.1033
	Sig.		.082	.102	.070	.062	1.000	.238	.055	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABTS

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	111	3	6.4430								
	112	3		9.6353							
	11	3		10.5627	10.5627						
	113	3			11.8547	11.8547					
	15	3			12.2243	12.2243	12.2243				
	12	3				13.5063	13.5063				
	18	3				13.5283	13.5283				
	16	3					13.9210				
	14	3					14.1050				
	17	3						15.9457			
	115	3						17.5390	17.5390		
	110	3							17.8860	17.8860	
	13	3							18.1410	18.1410	
	19	3								19.6053	
	114	3									21.6950
	Sig.		1.000	.280	.071	.078	.053	.068	.507	.062	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

DPPH

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	15	3	3.6323								
	11	3	3.9750	3.9750							
	16	3	5.0687	5.0687							
	111	3		5.3357							
	113	3			7.3280						
	14	3			8.5377	8.5377					
	17	3				9.0440					
	18	3				9.3163					
	112	3				9.5247					
	12	3				9.7873	9.7873				
	19	3					11.1537				
	13	3						12.8660			
	110	3							17.7183		
	114	3								23.2910	
	115	3									26.1530
	Sig.		.054	.067	.085	.110	.054	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

FRAP

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	15	3	5.2933							
	111	3	5.4427	5.4427						
	112	3	6.3487	6.3487	6.3487					
	113	3		7.0083	7.0083					
	11	3			7.2910					
	16	3			7.2943					
	18	3				8.9603				
	14	3				9.2407				
	12	3					11.9770			
	13	3					12.5820	12.5820		
	17	3					13.4553	13.4553		
	115	3						14.1297		
	19	3							20.9073	
	114	3							21.8283	21.8283
	110	3								22.7597
	Sig.		.185	.052	.250	.705	.065	.054	.220	.215

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PL2.2. Kết quả xử lý số liệu nghiên cứu sấy thân rễ BLMH

SC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05						
			1	2	3	4	5	6	7
Duncan[a]	113	3	13.3533						
	15	3	13.8267						
	110	3	14.6100						
	111	3	14.6667						
	12	3		17.8333					
	19	3		19.2600					
	112	3		19.2933					
	14	3		20.5967	20.5967				
	16	3			23.2667	23.2667			
	18	3				24.7733	24.7733		
	11	3				25.8200	25.8200		
	13	3					27.1067		
	17	3					27.6700		
	114	3						42.2600	
	115	3							60.6067
	Sig.		.418	.091	.076	.106	.077	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TPC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Duncan[a]	111	3	.3867					
	113	3	.3900					
	15	3	.3967					
	18	3	.4333					
	110	3	.4367					
	12	3		.5433				
	11	3		.5867	.5867			
	14	3		.5900	.5900			
	19	3		.6233	.6233			
	16	3		.6467	.6467			
	112	3		.6533	.6533			
	17	3			.6900	.6900		
	13	3				.7867	.7867	
	114	3					.8833	
	115	3						1.9500
	Sig.		.384	.062	.079	.064	.064	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

TAC

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	113	3	.0767								
	15	3	.0800	.0800							
	112	3	.1033	.1033	.1033						
	16	3	.1067	.1067	.1067						
	11	3		.1200	.1200	.1200					
	110	3		.1200	.1200	.1200					
	12	3			.1267	.1267					
	18	3			.1367	.1367					
	111	3				.1533					
	13	3					.2067				
	17	3					.2100				
	114	3						.2467			
	19	3							.2967		
	14	3								.3367	
	115	3									.3800
	Sig.		.133	.052	.109	.103	.853	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABTS

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	110	3	1.2333								
	11	3		1.5267							
	111	3		1.5833	1.5833						
	113	3		1.6433	1.6433						
	112	3		1.6533	1.6533						
	12	3		1.7133	1.7133	1.7133					
	15	3			1.7600	1.7600	1.7600				
	18	3			1.7833	1.7833	1.7833				
	14	3				1.8867	1.8867	1.8867			
	19	3					1.9533	1.9533			
	16	3						2.0333			
	13	3							2.2333		
	17	3							2.2833		
	114	3								2.6633	
	115	3									2.9433
	Sig.		1.000	.077	.063	.093	.062	.141	.590	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

DPPH

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Duncan[a]	113	3	.2467							
	12	3	.2800							
	18	3		.4033						
	15	3		.4200						
	111	3		.4233						
	112	3		.4833						
	110	3			.7567					
	11	3				1.1900				
	16	3				1.2267	1.2267			
	17	3				1.2633	1.2633			
	14	3				1.3100	1.3100			
	19	3					1.3200			
	13	3						1.4733		
	114	3							2.0067	
	115	3								3.6167
	Sig.		.544	.188	1.000	.050	.126	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

FRAP

	chedosay	N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Duncan[a]	11	3	.5800								
	111	3	.6067	.6067							
	112	3	.6133	.6133							
	14	3	.6733	.6733							
	15	3		.7467	.7467						
	113	3		.7633	.7633						
	16	3			.8633	.8633					
	18	3			.8767	.8767					
	12	3				.9467	.9467				
	17	3				.9567	.9567				
	19	3					1.0767	1.0767			
	110	3						1.1800	1.1800		
	13	3							1.2733		
	114	3								1.4867	
	115	3									1.7233
	Sig.		.257	.065	.116	.257	.105	.171	.215	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PL3. Bố trí thí nghiệm và kết quả tối ưu hóa theo mô hình Box-Behnken

PL3.1. Ma trận bố trí thí nghiệm và kết quả tối ưu hóa chiết rễ ĐS theo mô hình Box-Behnken

TT	Mẫu	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	0−+0	70	40	30	80	57,21	78,11	54,46	108,93	97,91
2	0++0	70	60	30	80	43,08	58,82	53,86	106,14	100,93
3	−−00	60	40	20	80	44,61	60,91	**56,92**	111,20	78,80
4	0000	70	50	20	80	53,73	73,35	44,43	85,31	77,35
5	+0+0	80	50	30	80	57,24	78,15	43,06	85,04	81,10
6	−00−	60	50	20	60	27,52	37,57	35,11	73,91	57,39
7	00++	70	50	30	100	44,97	61,40	50,56	98,54	87,55
8	−00+	60	50	20	100	40,31	55,03	56,87	105,87	98,90
9	0+0−	70	60	20	60	33,77	46,11	40,95	79,30	81,63
10	00+−	70	50	30	60	36,77	50,20	46,43	88,01	76,16
11	00−−	70	50	10	60	32,79	44,77	28,47	57,94	54,80
12	+00+	80	50	20	100	52,13	71,18	42,28	80,05	75,13
13	++00	80	60	20	80	57,71	78,80	37,24	80,11	81,04
14	−0−0	60	50	10	80	**25,55**	**34,88**	29,87	63,53	49,87
15	−+00	60	60	20	80	37,35	51,00	45,85	90,10	82,07
16	0000	70	50	20	80	50,72	69,25	49,12	97,37	84,71
17	0+0+	70	60	20	100	41,95	57,28	49,40	93,14	85,58
18	−0+0	60	50	30	80	36,30	49,55	48,81	104,70	86,83
19	+00−	80	50	20	60	36,01	49,16	23,86	**48,33**	**42,07**
20	+0−0	80	50	10	80	38,36	52,38	**25,74**	51,06	50,61
21	+−00	80	40	20	80	**62,21**	**84,93**	40,48	89,95	81,47
22	0000	70	50	20	80	45,71	62,41	50,56	98,30	93,74
23	0−0+	70	40	20	100	54,04	73,78	54,22	**115,72**	**101,74**
24	0−0−	70	40	20	60	47,61	65,01	43,64	86,17	79,57
25	0−−0	70	40	10	80	42,04	57,40	40,76	80,06	71,66
26	00−+	70	50	10	100	38,80	52,98	52,32	99,50	98,07
27	0+−0	70	60	10	80	40,18	54,86	36,50	67,83	85,67

X_1: Nồng độ ethanol (%); X_2: Nhiệt độ chiết (^{0}C); X_3: Thời gian chiết (phút); X_4: Tỉ kệ nguyên liệu/dung môi (g/mL). Y_1: Hàm lượng saponins tổng số (mg EE/g DM); Y_2: Hiệu suất chiết saponins (%); Y_3: Hàm lượng phenolics (mg GAE/g DM); Y_4: Khả năng quét gốc tự do ABTS (mg TE/g DM); Y_5: Khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt FRAP (mg TE/g DM).

PL3.2. Ma trận bố trí thí nghiệm và kết quả tối ưu hóa chiết thân rễ BLMH theo mô hình Box-Benhken

TT	Mẫu	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	0++	70	30	8	53,60	67,21	**0,89**	**5,41**	**1,27**
2	000	70	20	7	50,50	63,32	0,83	5,13	1,24
3	++0	80	30	7	**64,92**	**81,41**	0,86	4,13	1,25
4	000	70	20	7	49,73	62,36	0,82	5,13	1,21
5	0−+	70	10	8	47,45	59,49	0,84	4,99	1,14
6	+0−	80	20	6	59,86	75,05	0,75	3,93	1,26
7	+0+	80	20	8	60,38	75,71	0,87	4,33	1,15
8	−0−	60	20	6	51,68	64,80	0,82	4,79	1,05
9	−0+	60	20	8	44,27	55,52	0,84	4,94	1,11
10	−+0	60	30	7	44,69	56,04	0,80	4,75	1,11
11	−−0	60	10	7	**36,88**	**46,24**	0,77	4,75	**1,04**
12	+−0	80	10	7	56,14	70,39	**0,71**	**3,89**	1,15
13	0−−	70	10	6	45,55	57,12	0,75	4,91	1,10
14	0+−	70	30	6	48,92	61,34	0,84	5,00	1,14
15	000	70	20	7	50,46	63,27	0,87	5,03	1,24

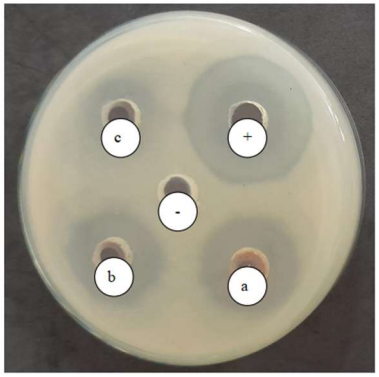
X_1: Nồng độ ethanol (%); X_2: Thời gian chiết (phút); X_3: Thời gian bức xạ (giây/phút); Y_1: Hàm lượng saponins tổng số (mg EE/g DM); Y_2: Hiệu suất chiết saponins (%); Y_3: Hàm lượng phenolics (mg GAE/g DM); Y_4: Khả năng quét gốc tự do ABTS (mg TE/g DM); Y_5: Khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp khử sắt FRAP (mg TE/g DM)

PL4. Hình ảnh kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật

PL4.1. Hình ảnh kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao ĐS



a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

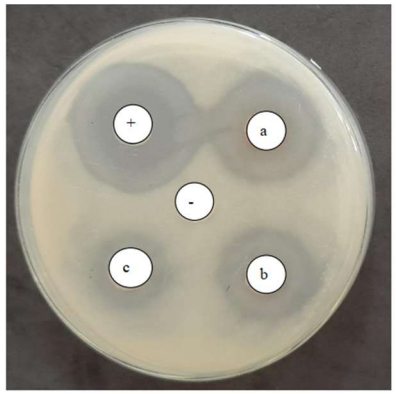


a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL
***Escherichia coli* ATCC 25922**



a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL

***Salmonella* spp.**

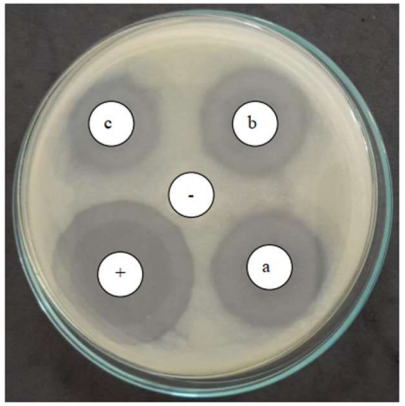


a: nồng độ 70mg/mL, b: nồng độ 50mg/mL, c: nồng độ 30mg/mL
Bacillus anthracis



a: nồng độ 70mg/mL, b: nồng độ 50mg/mL, c: nồng độ 30mg/mL
Candida albicans

PL4.2. Hình ảnh kiểm tra hoạt tính kháng vi sinh vật của bột vi bao BLMH



a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL

Escherichia coli ATCC 25922



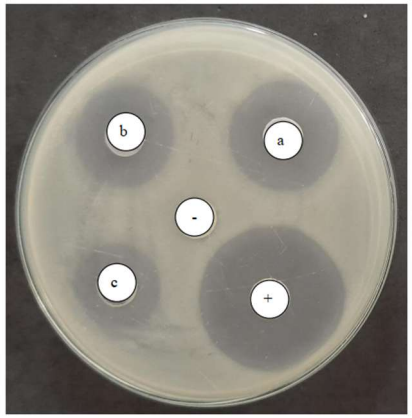
a: nồng độ 50mg/mL, b: nồng độ 30mg/mL, c: nồng độ 10mg/mL

***Salmonella* spp.**



a: nồng độ 70mg/mL, b: nồng độ 50mg/mL, c: nồng độ 30mg/mL

Bacillus anthracis



a: nồng độ 70mg/mL, b: nồng độ 50mg/mL, c: nồng độ 30mg/mL

Candida albicans

PL5. Kết quả kiểm tra vi sinh vật và kim loại nặng của bột vi bao

PL5. Kết quả kiểm tra vi sinh vật và kim loại nặng của bột vi bao

PL5.1 Kết quả kiểm tra vi sinh vật và kim loại nặng của bột vi bao ĐS



VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu ĐS**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	4,98 x 10^1 CFU/g	TCVN 4884 – 1 : 2015
2	*Coliform*	KPH	TCVN 6848 : 2007
3	*Escherichia coli*	KPH	TCVN 7924 – 2 : 2008
4	*Staphylococus aureus*	KPH	TCVN 4830 : 2005
5	Tổng số bào tử nấm men-nấm mốc	0,21 x 10^1 CFU/g	TCVN 8275 : 2010
6	*Clostridium perfringens*	KPH	TCVN 4991 : 2005

Ghi chú: - ***KPH:*** *Không phát hiện*

Phòng Phân tích trung tâm **Viện CNSH và Môi Trường**

ThS. Nguyễn Thị Huyền

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu ĐS**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán giếng thạch

Nồng độ mẫu (mg/mL)	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Escherichia coli*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Staphylococcus aureus*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Salmonella spp.*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Bacillus anthracis*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Candida albicans*
70	-	-	-	24,24,24	23,23,23
50	21,21,21	22,22,22.5	23,23.5,23.5	18,18,19	17.5,17.5,18
30	19,18.5,19	18.18.18	17,16.5,17	15,14,14.5	12.5,13,13
10	11,11,11	12,11,12	14,14,14	-	-
Chứng dương	29,29,29	29,30,29.5	29,28,29	30,30,30	29,28.5,28.5

Kết quả xác định giá trị MIC

Vi khuẩn	MIC (mg/mL)
Staphylococcus aureus	12.5
Escherichia coli	12.5
Salmonella	10
Bacillus anthracis	25
Candida albicans	27.5

Phòng Phân tích trung tâm **Viện CNSH và Môi Trường**

ThS. Nguyễn Thị Huyền

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu ĐS**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Hàm lượng Chì (Pb)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 8126 : 2009
2	Hàm lượng Thủy ngân (Hg)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 7604 : 2007
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 7603:2007
4	Hàm lượng Asen (As)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 9521:2012

Ghi chú: - ***KPH:*** *Không phát hiện* - ***LOD****: Giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích*

Phòng Phân tích trung tâm

ThS. Nguyễn Chị Huyền

Viện CNSH và Môi Trường

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

PL5.2 Kết quả kiểm tra vi sinh vật và kim loại nặng của bột vi bao BLMH

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu TD**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	3,85 x 10^1 CFU/g	TCVN 4884 – 1 : 2015
2	*Coliform*	KPH	TCVN 6848 : 2007
3	*Escherichia coli*	KPH	TCVN 7924 – 2 : 2008
4	*Staphylococus aureus*	KPH	TCVN 4830 : 2005
5	Tổng số bào tử nấm men-nấm mốc	0,12 x 10^1 CFU/g	TCVN 8275 : 2010
6	*Clostridium perfringens*	KPH	TCVN 4991 : 2005

Ghi chú: - ***KPH:*** *Không phát hiện*

Phòng Phân tích trung tâm **Viện CNSH và Môi Trường**

ThS. Nguyễn Chí Huyện

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu TD**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán giếng thạch

Nồng độ mẫu (mg/mL)	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Escherichia coli*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Staphylococcus aureus*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Salmonella spp.*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Bacillus anthracis*	Đường kính vòng ức chế (mm) – *Candida albicans*
70	-	-	-	24,24,24	25,25,25
50	24,24,24.5	25,25,25	26,26,26	22,22,22	22.5,22.5,22.5
30	22,21.5,21.5	23,23,23	21,21,21	13.5,14,14	16,16,16
10	18,18,18	18,17.5,18	15,15.5,15	-	-
Chứng dương	30,30,30	31,31,30.5	31,31,31	28,28,28	30,30,30

Kết quả xác định giá trị MIC

Vi khuẩn	MIC (mg/mL)
Staphylococcus aureus	10
Escherichia coli	10
Salmonella	10
Bacillus anthracis	25
Candida albicans	22.5

Phòng Phân tích trung tâm

ThS. Nguyễn Thị Thuyên

Viện CNSH và Môi Trường

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG
Institute of Biotechnology & Environment (IBE)
Địa chỉ: 567 Lê Duẩn, Tp. Buôn Ma Thuột, Đăk Lăk
Điện thoại: 02623.785.785 Fax: 02623.785785

Buôn Ma Thuột, ngày 06 tháng 08 năm 2025

PHIẾU TRẢ KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

1. **Người gửi mẫu: Trần Thanh Giang**
2. **Địa chỉ:** Trường Đại học Nha Trang, 02 Nguyễn Đình Chiểu, Nha Trang, Khánh Hòa
3. **Tên mẫu: Mẫu TD**
4. **Số lượng mẫu:**01
5. **Ngày gửi mẫu:** 03/07/2025
6. **Ngày trả kết quả:** 06/08/2025
7. **Kết quả phân tích:**

STT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả phân tích	Phương pháp phân tích
1	Hàm lượng Chì (Pb)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 8126 : 2009
2	Hàm lượng Thủy ngân (Hg)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 7604 : 2007
3	Hàm lượng Cadimi (Cd)	KPH LOD = 0,01 ppm	TCVN 7603:2007
4	Hàm lượng Asen (As)	KPH LOD = 0,001 ppm	TCVN 9521:2012

Ghi chú: - ***KPH:*** *Không phát hiện* - ***LOD****: Giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích*

Phòng Phân tích trung tâm

ThS. Nguyễn Thị Thuyên

Viện CNSH và Môi Trường

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

PL6. Phương trình đường chuẩn

Đường chuẩn TPC:

Nồng độ acid galic (ppm)	0	5	10	20	30	50
Abs	0,012	0,153	0,290	0,442	0,544	0,676
Phương trình đường chuẩn: y = 0,0139x, R = 0,9983						

Đường chuẩn TFC:

Nồng độ catechin (ppm)	0	5	10	20	30	50
Abs	0,0	0,174	0,358	0,689	1,007	1,614
Phương trình đường chuẩn: y = 0,0333x, R = 0,9991						

Đường chuẩn TSC:

Nồng độ escine (ppm)	50	100	150	200	300	400	500
Abs	0,076	0,173	0,214	0,288	0,365	0,601	0,882
Phương trình đường chuẩn: y = 0,0015x – 0,007, R^2 = 0,9990							

Đường chuẩn DRSC:

Nồng độ trolox (ppm)	0	50	150	200	250
Abs	0,953	0,768	0,398	0,213	0,028
Phương trình đường chuẩn: y = -0,0037x + 0,953, R^2 = 0,9973					

Đường chuẩn ARSC:

Nồng độ trolox (ppm)	0	100	200
Abs	1,071	0,550	0,066
Phương trình đường chuẩn: y = -0,0036x + 1,026, R^2 = 0,9995			

Đường chuẩn FRAP:

Nồng độ trolox (ppm)	0	100	200	300	400	500
Abs	0	0,710	1,506	2,402	3,189	3,871
Phương trình đường chuẩn: y = 0,0079x – 0,007, R^2 = 0,9993						