

Tối ưu hóa quá trình chiết saponin tổng số từ lá đu đủ *Carica papaya* L.

Optimizing of Conditions for Saponin Extract Process from *Carica Papaya* L. Leaves

Bùi Thị Niên, Đỗ Thị Hoa Viên*

Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội – Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

Đến Tòa soạn: 18-5-2017; chấp nhận đăng: 28-9-2018

Tóm tắt

Lá đu đủ được sử dụng hỗ trợ điều trị ung thư ở một số nước, trong đó có Úc, Mỹ, Brasil, Việt nam... Lá đu đủ có chứa các nhóm hoạt chất như: alkaloid, saponin, carotenoid, các hợp chất phenolic... Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tối ưu hóa bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm nhằm tìm ra điều kiện chiết xuất saponin hiệu quả từ lá đu đủ và phân tích định tính nhóm chất saponin có trong lá đu đủ. Cao chiết tổng số được chiết bằng MeOH. Ba yếu tố có ảnh hưởng nhiều đến quá trình chiết xuất cao chiết tổng số từ lá đu đủ là thời gian chiết, nhiệt độ chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được lựa chọn để khảo sát. Kết quả khảo sát cho thấy điều kiện chiết xuất cao chiết tổng số từ lá đu đủ tối ưu là thời gian chiết: 53 giờ, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/7 g/ml, nhiệt độ chiết: 49°C, thu được cao chiết tổng số với hàm lượng là $14,49 \pm 0,64\%$ so với nguyên liệu lá đu đủ khô. Tiếp tục chiết xuất saponin từ cao chiết tổng số với dung môi đặc hiệu là *n*-butanol, sau đó rửa bằng chloroform, chúng tôi thu được saponin thô toàn phần với hàm lượng là $1,69 \pm 0,37\%$ so với nguyên liệu lá đu đủ khô. Tiến hành phân tích định tính saponin bằng phương pháp tạo bọt và sắc kí bản mỏng, chúng tôi xác định được nhóm saponin có mặt trong lá đu đủ là saponin steroid.

Từ khóa: Chiết xuất, qui hoạch thực nghiệm, tối ưu hóa, saponin, saponin steroid.

Abstract

*Papaya leaves are used to support for treatment of cancer in some countries such as Australia, American, Brasil, Vietnam... Papaya leaf contains alkaloid, saponin, carotenoid, phenolic compounds... In this study we optimise saponin extracted conditions from papaya leaves by using Design Expert program, and qualitative analyse saponin in papaya leaves. The total extract is extracted by MeOH. Three main factors are examined. There are extracted time, temperature and the ratio of material/extracted solvent. The research result show that optimised extracted conditions for total extract from papaya leaves are extracted time: 52.5 hours, the rate of material/solvent: 1/7 and extracted temperature: 48.51°C. Continue to extract saponin from the total extract with *n*-butanol, then purify by chloroform, we obtained total crude saponin with the content is $1,69 \pm 0,37\%$ comparing with dried material. Qualitative analyse saponins with foaming reaction and thin layer chromatography, we determine that saponins presented in papaya leaves is saponin steroid.*

Keywords: Extract, Design Expert, optimization, saponin, saponin steroid.

1. Đặt vấn đề

Ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là khu vực châu Á, lá đu đủ được sử dụng như một loại thuốc dân gian để chữa lành các vết bỏng, giảm triệu chứng hen suyễn, điều trị giun đường ruột và các vấn đề về đường tiêu hóa, điều trị bệnh lỵ do nhiễm trùng amip [1]. Ngoài ra, lá đu đủ cũng được sử dụng làm tăng sự thèm ăn, giảm đau bụng kinh, giảm buồn nôn. Nước sắc lá đu đủ được công bố là có tác dụng chống ung thư, đây là bài thuốc dân gian của thổ dân ở Úc, đã được phổ biến qua nhiều nước khác trong đó có Việt Nam. Nghiên cứu gần đây nhất của các nhà khoa học Nhật

Bản và Mỹ cho thấy dịch chiết lá đu đủ có tác dụng ngăn chặn sự tăng trưởng của các dòng tế bào ung thư khác nhau. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy trong lá đu đủ có chứa các hoạt chất gây độc cho các tế bào ung thư làm tiêu diệt hoặc giảm quá trình phát triển của chúng, đồng thời có các hoạt chất kích thích sự phát triển của các dòng tế bào lympho Th1 trong hệ miễn dịch [2]. Saponin là một nhóm glycoside lớn thường gặp trong thực vật với cấu tạo gồm hai phần genin (sapogenin) và phần đường. Dựa vào cấu trúc của phần genin, saponin được chia thành hai nhóm saponin triterpene và saponin steroid. Saponin là nhóm chất có cấu trúc amphiphilic, có một đầu ưa nước (carbohydrate) và một đầu kỵ nước (steroid hoặc triterpene) [1]. Hoạt tính sinh học chính của saponin là kích thích hệ miễn dịch cơ thể và ức chế sự phát triển của khối u. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tối ưu hóa quá trình chiết xuất saponin thô tổng số từ lá đu đủ

* Địa chỉ liên hệ: Tel.: (+84) 961.806.218

Email: vien.dothihoa@hust.edu.vn

để làm tiền đề cho việc khảo sát hoạt tính sinh học và khả năng ứng dụng của chúng trong hỗ trợ phòng chống ung thư. Để chiết xuất saponin, có thể bằng phương pháp chiết thu dịch chiết tổng số, sau đó sử dụng các dung môi có độ phân cực tăng dần để chiết các nhóm chất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chiết loại các hợp chất không phân cực trước, sau đó chiết thu dịch tổng các chất phân cực, tiếp đến sử dụng n-butanol để chiết thu saponin [3, 4].

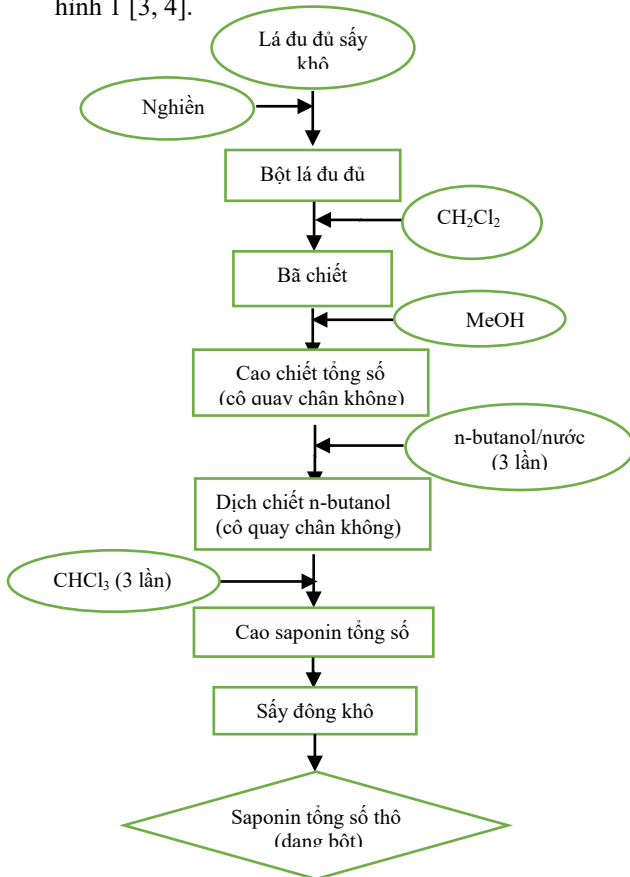
2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Lá đu đủ được thu hái tại huyện Đông Anh, Hà Nội. Lá được đảm bảo tươi xanh, trưởng thành khỏe mạnh và không bị sâu bệnh hại. Lá sau khi thu hái được làm sạch, sấy khô và nghiền nhỏ đến kích thước 1mm. Bột lá có độ ẩm 9,7%, được bảo quản trong túi bóng hàn kín và để nơi khô ráo, thoáng mát.

2.2. Phương pháp

Chiết xuất saponin tổng số thô như sơ đồ ở hình 1 [3, 4].



Hình 1. Quy trình chiết xuất saponin tổng số

Xác định độ ẩm nguyên liệu bằng thiết bị phân tích độ ẩm Sartorius MA 35. Xác định sự có mặt của

saponin trong dịch chiết tổng số từ lá đu đủ bằng các phản ứng định tính đặc trưng.

Tiến hành tối ưu cổ điển quá trình chiết cao chiết tổng số bằng dung môi MeOH tinh khiết ($\geq 98\%$) đối với ba yếu tố được lựa chọn khảo sát là nhiệt độ, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi để chọn khoảng tối ưu thích hợp.

Thực hiện tối ưu hóa quá trình chiết nói trên bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Xác định giá trị tối ưu của ba yếu tố: nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết bằng cách sử dụng mô hình Box-Benken, mỗi yếu tố tiến hành ở ba mức (+1; 0; -1). Các thí nghiệm được bố trí như trong bảng 1, gồm 17 thí nghiệm, trong đó có 5 thí nghiệm được thực hiện tại tâm với hàm mục tiêu là hàm lượng cao chiết tổng số thu được là lớn nhất. Các thí nghiệm được tiến hành cùng điều kiện trên máy lắc, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Mỗi thí nghiệm được tiến hành với 3 gam nguyên liệu. Xử lý số liệu thực nghiệm bằng phần mềm thống kê Design-Expert 10 trial [5, 6].

3. Kết quả và thảo luận

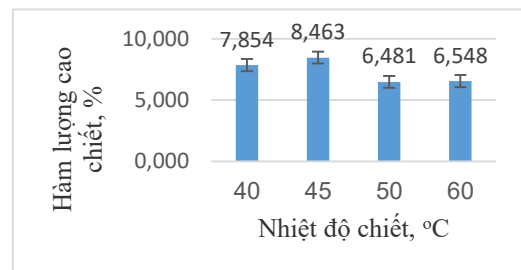
3.1. Khảo sát giá trị thích hợp của các thông số kỹ thuật trong quá trình chiết thu cao chiết tổng số

Chúng tôi lựa chọn MeOH tinh khiết ($\geq 98\%$) làm dung môi để chiết thu cao chiết tổng số [3, 4]; và chọn 3 thông số chính có ảnh hưởng nhiều đến quá trình chiết là nhiệt độ chiết, thời gian chiết và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi để tiến hành khảo sát [7]. Tiến hành tối ưu cổ điển với các khoảng khảo sát ban đầu đối với từng yếu tố là:

Nhiệt độ chiết	: 40 - 60°C
Thời gian chiết	: 24 - 72 giờ
Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi	: 1/5 - 1/8

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ chiết với giá trị thời gian chiết cố định 48 giờ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết 1/7. Kết quả được trình bày như hình 2.



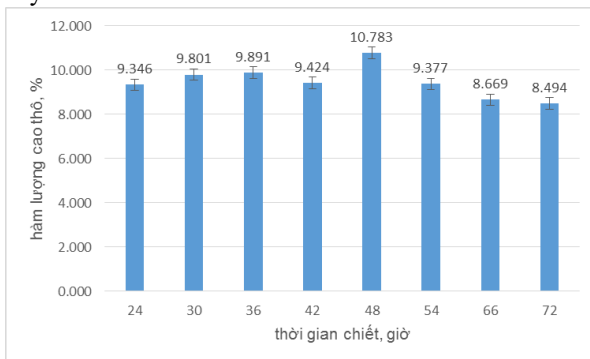
Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng cao chiết tổng số

Kết quả cho thấy: nhiệt độ chiết 45°C cho hàm lượng cao chiết cao nhất (8,463%). Khi tăng nhiệt độ chiết lên 50°C và 60°C thì hàm lượng cao chiết tổng số có xu hướng giảm đi. Điều này có thể được giải thích là do trong quá trình chiết bằng dung môi methanol, khi ta tăng dần nhiệt độ làm cho động học của quá trình chiết cũng tăng lên và các chất được chiết ra khỏi tế bào thực vật tốt hơn. Tuy nhiên, khi nhiệt độ càng tăng, một số chất có thể bị phân hủy, đồng thời nồng độ các chất có mặt trong dung môi chiết tăng lên dẫn đến bão hòa và làm giảm khả năng chiết tách các chất.

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian chiết

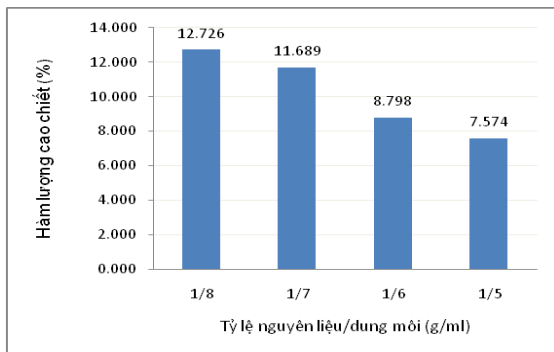
Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết với nhiệt độ chiết là 45°C, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết 1/7 như hình 3.

Kết quả chỉ ra rằng khi tăng thời gian chiết hàm lượng cao chiết cũng tăng lên và đạt cực đại tại 48 giờ. Tuy nhiên sau 48 giờ hàm lượng cao chiết lại giảm dần. Điều này có thể giải thích rằng tại thời điểm 48 giờ là thời điểm hòa tan lượng chất bão hòa nhiều nhất. Tuy nhiên sau đó các chất trong nguyên liệu hầu như đã được chiết tách và trong thời gian dài có thể một số chất bị biến chất thành những chất dễ bay hơi.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng cao chiết tổng số

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



Hình 4. Ảnh hưởng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng cao chiết tổng số

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết được khảo sát với 2 yếu tố còn lại được cố định là nhiệt độ chiết 45°C và thời gian chiết 48 giờ. Kết quả được thể hiện như ở hình 4. Kết quả khảo sát cho thấy khi tăng lượng dung môi chiết thì hàm lượng cao chiết tăng lên. Điều này hoàn toàn hợp lý vì lượng dung môi tăng làm tăng khả năng hòa tan các chất có trong nguyên liệu. Tuy nhiên hàm lượng dịch chiết thu được ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết 1/7 và 1/8 có sự khác biệt không đáng kể. Và hàm lượng dịch chiết thu được ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết 1/5 và 1/6 cũng không có sự khác biệt rõ ràng. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn khoảng giá trị tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết thích hợp là 1/6 - 1/8 g/ml.

3.2. Tối ưu hóa quá trình chiết dịch chiết tổng số bằng quy hoạch thực nghiệm

Bảng 2 gồm 17 thí nghiệm tương ứng với 17 giá trị khác nhau của cả ba yếu tố nhiệt độ, thời gian và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết. Ảnh hưởng của các yếu tố này đến hàm mục tiêu được xây dựng bởi hàm hồi quy bậc 2 cho hàm mục tiêu (hàm lượng cao chiết tổng số thu được) như sau:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=0}^k \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

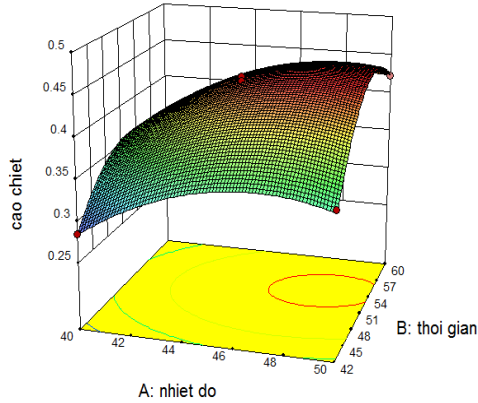
Trong đó, Y_i là hàm mục tiêu, β_0 là hệ số tự do; β_i , β_{ii} , β_{ij} là các vector tham số của mô hình được xác định qua thực nghiệm ($i, j = 1 \div 3$). Mô hình thống kê chỉ có ý nghĩa và được sử dụng sau khi thỏa mãn các tiêu chuẩn thống kê. Sự phù hợp và sự có nghĩa của mô hình được phân tích bằng phương pháp ANOVA, sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bằng chuẩn F. Kết quả phân tích cho thấy: giá trị p của mô hình thỏa mãn $p < 0,0001$ và mô hình hoàn toàn có nghĩa. Các yếu tố nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và các cặp yếu tố ảnh hưởng đều có nghĩa ($p < 0,05$). Tuy nhiên 2 cặp yếu tố nhiệt độ - tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian - tỉ lệ nguyên liệu/dung môi thì lại có giá trị $p > 0,05$ cho thấy chúng có ảnh hưởng tương tác đồng thời không nhiều đến mô hình. Hệ số hồi quy (R^2) càng tiến đến 1 càng tốt, ở đây tính được là 0,9894. Điều này thể hiện rằng có 98,94% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Mặt khác, giá trị R^2 tiên đoán là 0,8586 phù hợp với R^2 hiệu chỉnh là 0,9758 (độ lệch $0,1172 < 0,2$). Độ nhiễu là $21,569 > 4$ chỉ ra rằng tín hiệu đã đầy đủ. Như vậy, phương trình hồi quy tiên đoán tương thích với thực nghiệm. Từ các giá trị phân tích có nghĩa ở trên, giá trị hàm mong đợi mà phần mềm Design Expert 10 đưa ra được biểu diễn theo phương trình cụ thể sau:

$$Y_i = -7,0105 + 0,1371X_1 + 0,0629X_2 + 0,7038X_3 + 0,0003X_1X_2 - 0,0014X_1X_3 + 0,0008X_2X_3 - 0,0015X_1^2 - 0,0008X_2^2 - 0,0481X_3^2$$

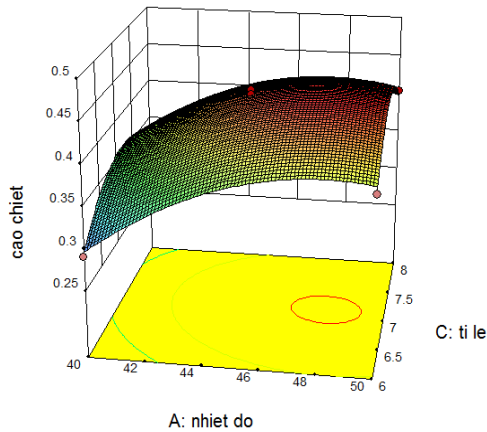
Trong đó Y_i là hàm lượng cao chiết khảo sát; các giá trị X_1, X_2, X_3 lần lượt là các giá trị của các yếu tố nhiệt độ, thời gian và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Bảng 1. Giá trị mức của 3 yếu tố nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

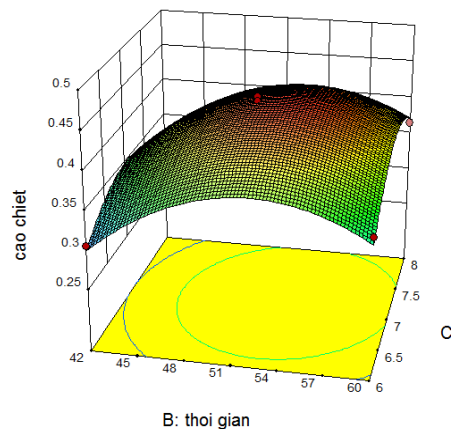
Các yếu tố	Kí hiệu	Đơn vị	Các giá trị khảo sát		
Nhiệt độ chiết	X ₁	°C	40	45	50
Thời gian chiết	X ₂	giờ	42	51	60
Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi	X ₃	g/ml	1/6	1/7	1/8



a. Nhiệt độ và thời gian chiết



b. Nhiệt độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi



c. Thời gian và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Hình 5. Bề mặt đáp ứng của từng yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết cao chiết tổng số

Bảng 2. Ma trận thực nghiệm với 3 yếu tố nhiệt độ, thời gian và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết

Số TN	Yếu tố thí nghiệm			Hàm mục tiêu
n	X ₁ Nhiệt độ chiết (°C)	X ₂ Thời gian chiết (giờ)	X ₃ Tỉ lệ chiết (g/l)	Y _i Lượng cao chiết tổng số từ 3g nguyên liệu (g)
1	40	42	1/7	0,285
2	50	42	1/7	0,345
3	40	60	1/7	0,306
4	50	60	1/7	0,423
5	40	51	1/6	0,291
6	50	51	1/6	0,387
7	40	51	1/8	0,336
8	50	51	1/8	0,405
9	45	42	1/6	0,306
10	45	60	1/6	0,351
11	45	42	1/8	0,294
12	45	60	1/8	0,366
13	45	51	1/7	0,435
14	45	51	1/7	0,444
15	45	51	1/7	0,435
16	45	51	1/7	0,447
17	45	51	1/7	0,441

Bề mặt đáp ứng của từng yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết cao chiết tổng số được mô phỏng như ở hình 5.

Phương trình (2) cho thấy trong 3 yếu tố khảo sát thì tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết có ảnh hưởng lớn nhất đến hàm mong đợi là hàm lượng cao chiết tổng số; còn nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng ít hơn. Để bảo toàn hoạt tính của các chất chiết, chúng tôi không chiết ở nhiệt độ cao mà chỉ khảo sát trong khoảng nhiệt độ từ 40 đến 60°C. Kết quả tối ưu bằng quy hoạch thực nghiệm cho thấy ở khoảng biến thiên nhiệt độ này thì việc kéo dài thêm thời gian chiết cũng không ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng cao chiết tổng số thu được.

Dựa vào các giải pháp tối ưu mà phần mềm đưa ra, chúng tôi lựa chọn các thông số tối ưu cho quá trình chiết cao chiết tổng số quy mô phòng thí nghiệm như sau: nhiệt độ chiết 49°C, thời gian chiết 53 giờ và tỉ lệ chiết 1/7 g/ml.

Chúng tôi tiến hành chiết xuất thu cao chiết tổng số từ lá đu đủ theo các thông số đã tối ưu ở trên, số thí nghiệm lặp lại 3 lần. Kết quả thu được hàm lượng cao chiết tổng số trung bình là 0,4347 ± 0,0064 gam trong khi giá trị dự đoán của mô hình là 0,4554 gam, sự sai khác 4,5% (< 5%) nằm trong khoảng sai số chấp nhận được.

3.3. Chiết saponin từ cao chiết tổng số bằng hệ dung môi n-butanol và nước

Cao chiết tổng số được tiếp tục chiết lỏng - lỏng bằng hệ dung môi n-butanol (nồng độ ≥ 98%) và

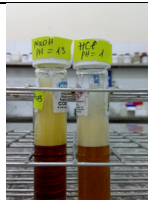
nước. Tiến hành khảo sát tỉ lệ n-butanol và nước với 3 tỉ lệ chiết 1/3, 1/4 và 1/5 [7], thu pha chiết n-butanol và tiến hành sấy đến khối lượng không đổi thu cao chiết saponin. Kết quả chiết trong bảng 3 cho thấy lượng cao chiết saponin thu được ở tỉ lệ n-butanol/nước 1/4 là cao nhất ($0,0938 \pm 0,0017$ gam). Tiến hành chiết lỏng-lỏng được ở tỉ lệ n-butanol/nước 1/4 để thu cao chiết saponin, sau đó tinh sạch bằng chloroform để loại tạp chất, chúng tôi thu được hàm lượng saponin tổng số là $0,0509 \pm 0,0342$ gam từ 3 gam nguyên liệu khô ban đầu. Hàm lượng cao thô saponin so với nguyên liệu khô ban đầu chiếm $1,69 \pm 0,37\%$, cao hơn hẳn so với kết quả chiết của tác giả Bùi Thanh Phương ($0,96\%$) [7].

Bảng 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ n-butanol/nước đến quá trình chiết saponin

Tỉ lệ n-butanol/nước	Lượng cao chiết saponin (g/3g nguyên liệu)
1/3	$0,0935 \pm 0,0021$
1/4	$0,0938 \pm 0,0017$
1/5	$0,0861 \pm 0,0019$

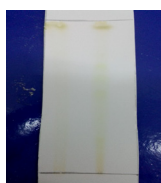


a. Tạo bột trong môi

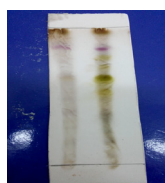


b. Tạo bột trong môi trường axit và môi trường kiềm

Hình 6. Định tính saponin bằng phương pháp tạo bột



M1 M2
a. Trước khi phun TT



M1 M2
b. Sau khi phun TT

Hình 7. Định tính saponin bằng SKBM (M1, M2: saponin tổng số trước và sau khi tinh sạch bằng chloroform; TT: thuốc thử)

3.4. Phân tích định tính saponin

Phân tích định tính saponin trong các dịch chiết lá đu đủ bằng phương pháp tạo bột và sắc ký bản mỏng (SKBM) [1]. Kết quả định tính bằng phương pháp tạo bột cho thấy trong môi trường nước bột cao và bền trong hơn 30 phút (hình 6a), điều đó khẳng định thêm sự có mặt của các nhóm chất saponin trong lá đu đủ. Trong môi trường kiềm (pH = 13) bột cao hơn hẳn so với môi trường axit (pH = 1) chứng tỏ rằng trong lá đu đủ chứa chủ yếu nhóm

saponin steroid (hình 6b). Phân tích định tính saponin bằng SKBM với dung môi triển khai là n-butanol bão hòa trong nước, thuốc thử hiện màu là H_2SO_4 10% trong ethanol, sấy khô ở $105-110^\circ C$. Trong sắc ký đồ SKBM có các vết màu tím hoa cà - đặc trưng cho những hợp chất saponin có liên kết đôi trong phân tử (hình 7).

4. Kết luận

Sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm bằng đáp ứng bề mặt đã xác định được điều kiện tối ưu cho quá trình chiết thu cao chiết tổng số từ lá đu đủ bằng dung môi MeOH là nhiệt độ $49^\circ C$, thời gian 53 giờ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/7 g/ml. Tiếp tục chiết thu saponin từ cao chiết tổng số bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng, sử dụng hệ dung môi n-butanol/nước với tỉ lệ 1/4, rồi loại tạp chất bằng chloroform thu được saponin tổng số với hàm lượng là $1,69 \pm 0,37\%$ so với nguyên liệu lá đu đủ khô. Kết quả phân tích định tính cũng sơ bộ xác định các hợp chất saponin có mặt trong lá đu đủ thuộc nhóm saponin steroid.

Lời cảm ơn.

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số CNHD.ĐT.065/15-17 thuộc Chương trình Hóa Dược, Bộ Công thương.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Môn Dược Liệu, Bài giảng Dược liệu tập 1, NXB Hà Nội, Hà Nội (1998).
- [2] Nam.H.Dang Noriko Otsuki, Emi Kumagai, Akira Kondo, Satoshi Iwata, Chikao Morimoto - Aqueous extract of Carica papaya leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects, Journal of Ethnopharmacology, 127 (2010) 760-767.
- [3] K. Hostettmann and A. Marston, Saponins, Cambridge University Press (1995).
- [4] K. Hostettmann et al., Guide des travaux pratiques de phytochimie, Institut de Pharmacognosie et Phytochimie - Université de Lausanne, Suisse (2000).
- [5] Alireza Azizian Neda Zangeneh, Leonard Lye, and Radu Popescu, Application of response surface methodology in numerical geotechnical analysis, The 55th Canadian Society for Geotechnical Conference, Hamilton, Ontario, University of Newfoundland (2002).
- [6] Mustapha RGUIG, Méthodologie des surfaces de réponse pour l'analyse en fiabilité des plates-formes pétrolières offshore fissuré, Mécanique [physics.med-ph], Université de Nantes Faculté des Sciences et des Techniques, Français (2005).
- [7] Bùi Thị Thanh Phương, Nghiên cứu chiết xuất và khảo sát hoạt tính miễn dịch của nhóm hoạt chất saponin từ lá đu đủ, Luận văn Thạc sĩ Kỹ thuật, Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội (2014).

