

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS OF POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS FROM BREADFRUIT LEAVES (*Artocarpus altilis*)

Nguyen Thi Ai Lan¹, Tran Chi Linh^{2*}

¹Tra Vinh University, ²Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 28/4/2022	This study aims to optimize the extraction conditions of polyphenols and flavonoids from breadfruit leaves. To achieve this, the Box-Behnken design was implemented for the optimization itself. The influence of four factors, including: raw material/ solvent ratio, ethanol concentration, ultrasonic time and ultrasonic temperature on the extraction of polyphenols and flavonoids were studied. As a result, the optimal extraction conditions were extraction time of 15.98 min, extraction temperature of 69°C, solid-to-solvent ratio of 1/30 (w/v) and ethanol concentration of 69% for ultrasound-assisted extraction. Under these conditions, the measured polyphenols and flavonoids were 227.38±1.27 mg/g GAE and 113.36±2.07 mg/g QE, respectively, which was in agreement with the predicted value (TPC=228.46 mg/g GAE; TFC=112.58 mg/g QE). Optimum extraction of breadfruit leaves has good ability to neutralize free radicals 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (EC ₅₀ =56.57±0.10 µg/mL) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (EC ₅₀ =68.85±0.53 µg/mL) and nitric oxide (EC ₅₀ =77.21±0.84 µg/mL).
Revised: 14/6/2022	
Published: 14/6/2022	
KEYWORDS	
Antioxidant	
<i>Artocarpus altilis</i>	
Box-Behnken	
Flavonoids	
Polyphenols	

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT POLYPHENOL VÀ FLAVONOID TỪ LÁ CÂY SA KÊ (*Artocarpus altilis*)

Nguyễn Thị Ái Lan¹, Trần Chí Linh^{2*}

¹Trường Đại học Trà Vinh, ²Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 28/4/2022	Nghiên cứu này nhằm mục đích tối ưu hóa điều kiện chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá sa kê. Để đạt được điều này, thiết kế Box-Behnken đã được sử dụng để tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá sa kê. Ảnh hưởng của bốn yếu tố, bao gồm: tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi, nồng độ ethanol, thời gian và nhiệt độ siêu âm đến quá trình chiết xuất polyphenol, flavonoid đã được thực hiện. Kết quả cho thấy, điều kiện chiết xuất tối ưu là ở thời gian 15,98 phút, nhiệt độ 69°C, tỷ lệ nguyên liệu dung/ dung môi 1/30 (w/v) và nồng độ ethanol 69% với sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Trong điều kiện này, hàm lượng polyphenol (TPC), flavonoid (TFC) đo được lần lượt là 227,38±1,27 mg GAE/g cao chiết và 113,36±2,07 mg QE/g cao chiết, phù hợp với giá trị dự đoán (TPC=228,46 mg GAE/g cao chiết; TFC=112,58 mg QE/g cao chiết). Cao tối ưu lá sa kê có khả năng trung hòa tốt các gốc tự do 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (EC ₅₀ =56,57±0,10 µg/mL) và 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (EC ₅₀ =68,85±0,53 µg/mL) và nitric oxide (EC ₅₀ =77,21±0,84 µg/mL).
Ngày hoàn thiện: 14/6/2022	
Ngày đăng: 14/6/2022	
TỪ KHÓA	
Chống oxy hóa	
Sa kê	
Box-Behnken	
Flavonoid	
Polyphenol	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5924>

* Corresponding author. Email: tclinh@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

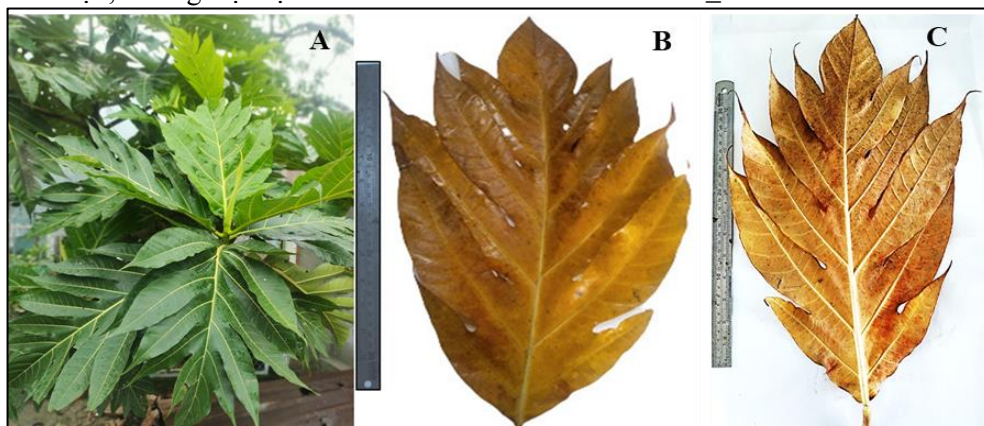
Gốc tự do là phân tử có một hoặc nhiều electron chưa ghép đôi ở obitan lớp ngoài cùng [1]. Nhiều gốc tự do ở dạng oxy phản ứng (reactive oxygen species, ROS) và nitơ phản ứng (reactive nitrogen species, RNS) là một phần không thể thiếu của các quá trình sinh lý bình thường trong cơ thể con người [2]. Tuy nhiên, các gốc tự do sẽ được sản sinh quá mức khi cơ thể tiếp xúc với bức xạ, hóa chất độc hại, thuốc lá, rượu bia và tiêu thụ chất béo bị oxy hóa [3]. Các ROS và RNS được sản sinh quá mức có thể dẫn đến tổn thương oxy hóa đối với các phân tử sinh học: lipid, protein, DNA và màng tế bào đến sự phát triển của các bệnh tim mạch, ung thư, đái tháo đường, tăng huyết áp và rối loạn thoái hóa thần kinh [4], [5]. Chất chống oxy hóa có khả năng loại bỏ các gốc tự do có tiềm năng rất lớn trong việc cải thiện các bệnh lý do ROS và RNS gây [6]. Các chất chống oxy hóa tổng hợp phổ biến như: butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole và propylgallate được sử dụng nhiều lại gây ảnh hưởng đến tuổi thọ và có nhiều tác dụng phụ [7]. Chính vì vậy, ngày càng có nhiều quan tâm đến việc chiết xuất các chất chuyển hóa thứ cấp từ thực vật, để có được một giải pháp thay thế các hợp chất chống oxy hóa tổng hợp nhưng an toàn, hiệu quả và chi phí thấp.

Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ thực vật thuộc nhóm polyphenol, flavonoid có các hoạt động dược lý quan trọng, bao gồm: chống oxy hóa, chống ung thư, ức chế enzyme và chống viêm [8]. Polyphenol và flavonoid có nhiều đặc điểm sinh hóa, hoạt tính sinh học khác nhau, nhưng đặc tính được mô tả tốt nhất của hầu hết các polyphenol, flavonoid là khả năng chống oxy hóa [9]. Các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid đã được chứng minh là có sự hiện diện trong các chiết xuất từ cây sa kê (*Artocarpus altalis*) [10], [11]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy sa kê có tác dụng chống ung thư, bảo vệ tim mạch, kiểm soát huyết áp, bảo vệ gan và nhiều hoạt tính sinh học đáng quý khác [7]. Các hoạt tính sinh học mà cây sa kê sở hữu được chứng minh là có mối quan hệ mật thiết với hàm lượng polyphenol (TPC) và flavonoid (TFC) [12]. Tuy nhiên, những nghiên cứu để tối ưu hóa điều kiện chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá sa kê (LSK) vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm tìm ra điều kiện chiết xuất tối ưu cao chiết giàu polyphenol và flavonoid từ lá sa kê. Nghiên cứu góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc định hướng khai thác dược liệu một cách hiệu quả.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cây sa kê được thu lấy lá tại quận Bình Thủy, thành phố Cần Thơ được trình bày trong Hình 1. LSK được sử dụng trong nghiên cứu là những lá già khô vừa mới rụng. Mẫu LSK được định danh và lưu trữ tại phòng thí nghiệm Hóa Sinh Lâm Sàng (Phòng C11.105), bộ môn Hóa Sinh, Khoa Y - Dược, trường Đại học Trà Vinh với mã số lưu trữ là: CT_Aal202001050011.



Hình 1. Mẫu lá sa kê được sử dụng trong nghiên cứu

Ghi chú: A-Một nhánh sa kê, B-Mặt trên lá sa kê già khô vừa mới rụng; C-Mặt dưới lá sa kê già khô vừa mới rụng

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý nguyên liệu và xác định độ ẩm

LSK sau khi thu về được rửa sạch, loại bỏ phần sâu bệnh, cắt nhỏ và phơi khô trong bóng râm. Sau đó, LSK được xay nhuyễn thành bột và đem rây qua khay để thu được hạt bột được liệu có kích thước hạt là 60 mesh. Bột được liệu LSK có độ ẩm là $4,75 \pm 0,11\%$ được xác định theo mô tả trong Dược Điển Việt Nam V [13]. Bột được liệu LSK được bảo quản trong túi nhựa PE, đặt trong hộp nhựa kín và lưu trữ ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố đơn và tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol, flavonoid từ bột được liệu LSK

Máy siêu âm gia nhiệt (Derui DR-MH30, China) với tần số 40 kHz được sử dụng để phát sóng siêu âm hỗ trợ chiết xuất polyphenol và flavonoid. Bột được liệu LSK được chiết xuất polyphenol, flavonoid trong các điều kiện: tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi từ 1/10 đến 1/40 (w/v); ethanol từ 40 đến 99,5% (v/v); nhiệt độ siêu âm từ 30 đến 90°C ; thời gian siêu âm từ 5 đến 35 phút. Trong quá trình khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn: ethanol 90%, nhiệt độ 30°C , thời gian siêu âm 5 phút và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/10 (w/v) được cố định. Tiến hành lọc dịch chiết cô đuổi dung môi thu lấy cao chiết để xác định TPC và TFC theo mô tả trong mục 2.2.3. Sau khi tiến hành khảo sát các đơn nhân tố, 03 yếu tố có ảnh hưởng nhiều đến TPC, TFC trong cao LSK được chọn để xây dựng quy trình chiết xuất tối ưu. Phương pháp đáp ứng bề mặt theo thiết kế Box-Behnken với ba yếu tố, ba cấp độ trong phần mềm Design expert 11.0 được sử dụng để thiết kế thí nghiệm và đánh giá mô hình. Các điều kiện chiết xuất tối ưu sẽ được sử dụng để điều chế cao tối ưu và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa theo mô tả trong mục 2.2.4.

2.2.3. Phương pháp định lượng polyphenol và flavonoid

TPC trong các cao LSK được xác định theo mô tả của Patra và cộng sự (2020) [14]. TPC được biểu thị bằng mg gallic acid (GAE) trên 1 g cao chiết, dựa vào đường chuẩn: $y = 0,0103x + 0,1147$ ($R^2 = 0,9991$).

TFC trong các cao LSK được xác định theo mô tả của Akanni và cộng sự (2014) [7]. TFC được biểu thị bằng mg quercetin (QE) trên 1 g cao chiết, dựa vào đường chuẩn: $y = 0,0049x + 0,0039$ ($R^2 = 0,9978$).

2.2.4. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao tối ưu LSK

Hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) được thực hiện theo Khorasani và cộng sự (2015) [15]. Phản ứng gồm: 990 μL ABTS⁺ với 10 μL cao tối ưu LSK, trong 6 phút, 25°C . Độ hấp thụ quang phổ được xác định ở bước sóng 734 nm.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được thực hiện theo Mensor và cộng sự (2001) [16]. Cao tối ưu LSK 960 μL được phản ứng với 40 μL DPPH (1000 $\mu\text{g/mL}$). Mẫu thử được ủ tối, 30 phút ở 25°C và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO[•]) được thực hiện theo Ebrahimzadeh và cộng sự (2009) có điều chỉnh [17]. Cao tối ưu LSK 1 mL được cho phản ứng với 1 mL natri nitroprusside (5 mmol/L) trong 150 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 0,5 mL thuốc thử Griess được thêm vào và tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 546 nm.

Vitamin C được sử dụng làm chất đối chứng dương ở cả 3 phương pháp chống oxy hóa. Hiệu suất chống oxy hóa và nồng độ trung hòa 50% gốc tự do (half maximal effective concentration, EC₅₀) được xác định theo mô tả của Khorasani và cộng sự (2015) [15].

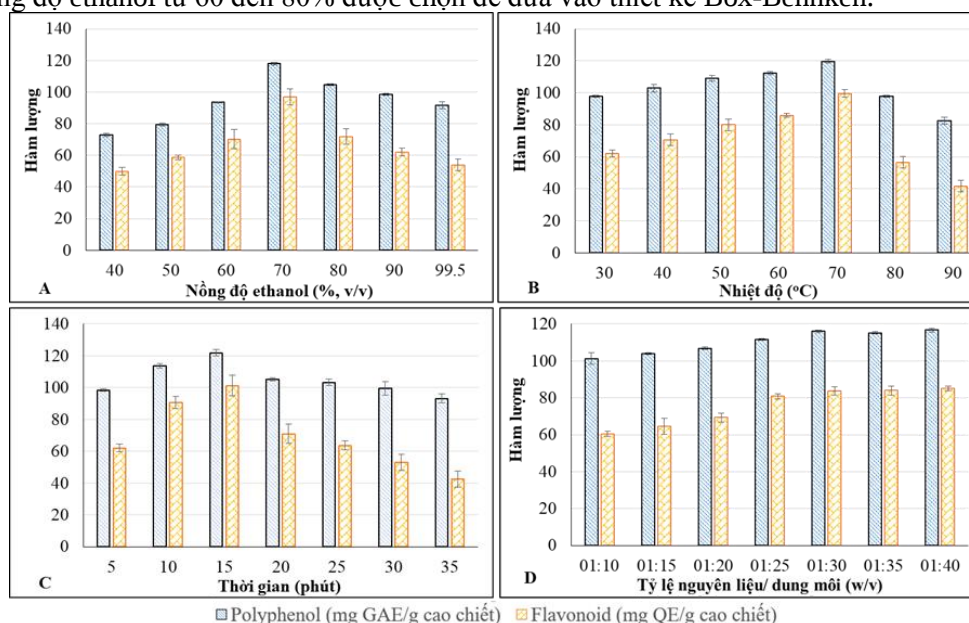
2.2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu trong khảo sát đơn yếu tố được trình bày dưới dạng MEAN $\pm$ SEM và xử lý bằng phần mềm Minitab 16.0 kiểm định ANOVA-Tukey's. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft excel 2013. Số liệu và biểu đồ trong mô hình tối ưu được xử lý bằng phần mềm Design expert 11.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến quá trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ LSK

TPC và TFC được chứng minh là rất thấp khi sử dụng đơn dung môi là ethanol hoặc nước để chiết xuất [18]. Sự kết hợp giữa ethanol và nước với tỷ lệ thích hợp sẽ tạo điều kiện chiết xuất hiệu quả polyphenol và flavonoid [19]. Trong **Hình 2A** sự kết hợp giữa ethanol và nước ở các tỷ lệ khác nhau ảnh hưởng đáng kể đến TPC và TFC. Cụ thể, TPC và TFC tăng liên tục từ nồng độ ethanol 40% (TPC=72,81±0,99 mg GAE/g cao chiết; TFC=49,86±2,44 mg QE/g cao chiết) đến 70% (TPC=117,99±0,75 mg GAE/g cao chiết; TFC=97,11±5,09 mg QE/g cao chiết) và bắt đầu giảm ở 80% (TPC=104,80±0,65 mg GAE/g cao chiết; TFC=71,85±4,89 mg QE/g cao chiết). Do đó, nồng độ ethanol từ 60 đến 80% được chọn để đưa vào thiết kế Box-Behnken.



Hình 2. Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong cao LSK

Ghi chú: A: Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến TPC và TFC; B: Ảnh hưởng của nhiệt độ siêu âm đến TPC và TFC; C: Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến TPC và TFC; D: Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi đến TPC và TFC

Nghiên cứu của Hossain và cộng sự (2011) cho thấy, nhiệt độ là yếu tố chi phối trong quá trình chiết xuất polyphenol và flavonoid [20]. Ở **Hình 2B**, TPC và TFC tăng khi được chiết ở nhiệt độ 30°C (TPC=97,65±0,61 mg GAE/g cao chiết; TFC=61,98±2,35 mg QE/g cao chiết) đến 70°C (TPC=119,66±1,32 mg GAE/g cao chiết; TFC=99,54±2,35 mg QE/g cao chiết) và bắt đầu giảm ở 80°C. Do đó, phạm vi nhiệt độ siêu âm từ 60°C đến 80°C đã được chọn vào thiết kế Box-Behnken. Sự gia tăng nhiệt độ của dung môi làm giảm độ nhớt của môi trường chiết xuất, giúp dung môi thâm nhập vào các hạt bột dược liệu và làm tăng hiệu suất chiết xuất [18]. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng quá cao có thể dẫn đến sự phân hủy hoặc biến chất của polyphenol và flavonoid [21].

Như thể hiện trong **Hình 2C**, TPC (121,88±2,08 mg GAE/g cao chiết) và TFC (101,18±6,47 mg QE/g cao chiết) đạt cao nhất sau 15 phút đánh siêu âm và bắt đầu giảm đáng kể sau đó ($p < 0,05$). Kết quả này có thể được giải thích là do polyphenol, flavonoid trong hạt bột dược liệu phóng thích ra ngoài hòa tan trong dung môi nhanh trong thời gian ngắn, tuy nhiên khi kéo dài thời gian siêu âm làm cho các hợp chất polyphenol, flavonoid bị phân hủy và tạo nhũ tương dẫn đến giảm hàm lượng [22], [23]. Thời gian siêu âm từ 10 đến 20 phút đã được chọn cho thiết kế Box-Behnken.

Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi đến TPC và TFC được trình bày trong **Hình 2D**. TPC và TFC tăng liên tục từ tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/10 (w/v,

TPC=101,27±3,12 mg GAE/g cao chiết; TFC=60,45±1,41 mg QE/g cao chiết) đến 1/30 (w/v, TPC=115,99±0,68 mg GAE/g cao chiết; TFC=83,67±2,21 mg QE/g cao chiết) và sau đó tăng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$). Nguyên nhân có thể là do ở tỷ lệ nguyên liệu là 1/30 thì hàm lượng các chất chiết xuất đã đạt đến độ bão hòa [21]. Do đó, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/30 đã được chọn để sử dụng trong các khảo sát tiếp theo.

3.2. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ LSK

TPC và TFC chiết xuất được từ bột dược liệu LSK chịu ảnh hưởng đáng kể bởi nồng độ ethanol (60-80%, v/v), nhiệt độ siêu âm (60-80°C) và thời gian siêu âm (10-20 phút) nên được chọn đưa vào thiết kế Box-Behnken. Ngoài ra, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/30 được cố định trong quá trình tối ưu. Trong 17 nghiệm thức của thiết kế Box-Behnken, TPC và TFC thu được cao nhất ở 5 nghiệm thức trung tâm (từ nghiệm thức 13 đến 17, Bảng 1).

Bảng 1. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố của LSK

Nghiệm thức	Các biến độc lập			Hàm lượng polyphenol (mg GAE/g cao chiết)	Hàm lượng flavonoid (mg QE/g cao chiết)
	A (% v/v)	B (°C)	C (phút)		
1	60	60	15	124,85 ^e ±1,94	60,45 ^{fg} ±2,27
2	80	60	15	131,33 ^{de} ±2,24	65,21 ^{c-f} ±6,27
3	60	80	15	108,67 ^f ±2,97	53,37 ^g ±1,84
4	80	80	15	86,67 ^g ±1,12	43,31 ^h ±2,48
5	60	70	10	146,21 ^c ±1,94	72,83 ^c ±1,70
6	80	70	10	139,09 ^{cd} ±2,24	69,70 ^{cde} ±1,18
7	60	70	20	174,69 ^b ±2,97	87,52 ^b ±1,70
8	80	70	20	166,28 ^b ±2,97	83,17 ^b ±1,89
9	70	60	10	125,50 ^e ±4,04	62,63 ^{def} ±3,70
10	70	80	10	86,02 ^g ±3,88	42,76 ^h ±3,30
11	70	60	20	143,62 ^c ±4,48	70,79 ^{cd} ±1,43
12	70	80	20	122,27 ^e ±2,24	61,27 ^{efg} ±2,45
13	70	70	15	226,47 ^a ±2,97	112,42 ^a ±2,05
14	70	70	15	224,52 ^a ±7,35	112,29 ^a ±6,38
15	70	70	15	226,47 ^a ±2,97	111,74 ^a ±1,43
16	70	70	15	227,77 ^a ±1,94	111,06 ^a ±0,41
17	70	70	15	226,47 ^a ±2,24	110,24 ^a ±2,16

Ghi chú: A-Nồng độ ethanol (% v/v); B-Nhiệt độ (°C); C-Thời gian siêu âm (phút). Các giá trị cố mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

Dựa vào giá trị thực nghiệm trong Bảng 1, nghiên cứu đã áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai dự đoán TPC và TFC như sau:

$$Y_{\text{Polyphenol}} = -5786,155 + 58,06412 \times A + 107,57587 \times B + 34,837 \times C - 0,0712 \times A \times B - 0,00645 \times A \times C + 0,09065 \times B \times C - 0,381225 \times A^2 - 0,753375 \times B^2 - 1,266 \times C^2$$

$$Y_{\text{Flavonoid}} = -2855,25625 + 28,441 \times A + 53,52287 \times B + 15,85575 \times C - 0,03705 \times A \times B - 0,0061 \times A \times C + 0,05175 \times B \times C - 0,185112 \times A^2 - 0,374537 \times B^2 - 0,58935 \times C^2$$

Trong đó, A là yếu tố nồng độ ethanol; B là yếu tố nhiệt độ; C là yếu tố thời gian siêu âm.

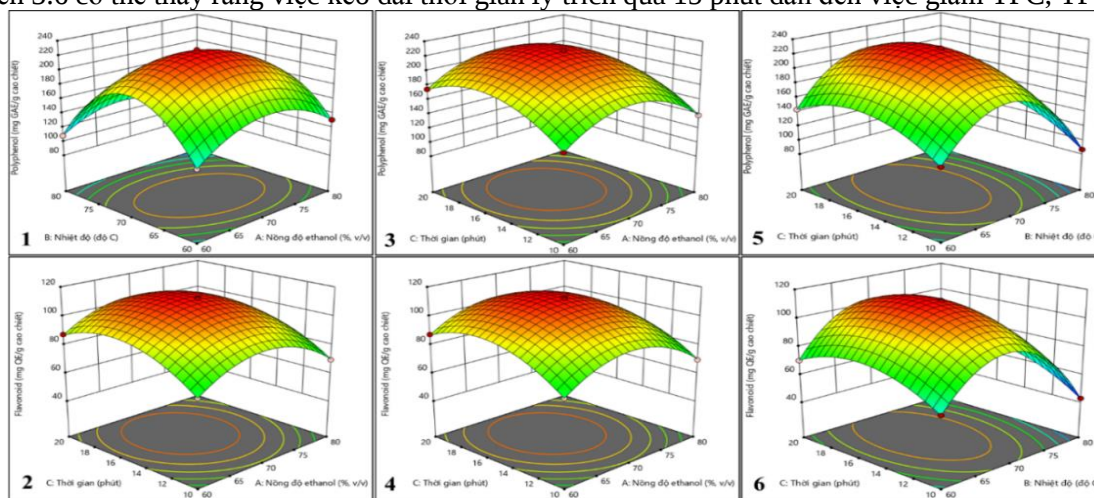
Phân tích ANOVA đã được thực hiện để đánh giá tác động của các yếu tố đơn, sự tương tác giữa các yếu tố và mức độ phù hợp của mô hình dự đoán với thực nghiệm trình bày trong Bảng 2. Kết quả cho thấy, nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian siêu âm đều có sự tương tác với nhau ($p<0,05$) và ảnh hưởng đến TPC, TFC. Sự không phù hợp (Lack of fit, $p_{\text{polyphenol}}=0,9822$, $p_{\text{flavonoid}}=0,7856$) của mô hình dự đoán không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$), hệ số tương quan ($R^2_{\text{polyphenol}}=0,9999$; $R^2_{\text{flavonoid}}=0,9996$) của mô hình dự đoán $>0,8$. Hệ số biến động (CV) của TPC và TFC lần lượt là 0,57% và 0,99%, giá trị CV tương đối thấp ($CV<10\%$) cho thấy mô hình phân hồi có độ tin cậy tốt. Nghiên cứu của Lai và cộng sự (2014) [22], Tomaz và cộng sự (2016) [23] và Cui và cộng sự (2019) [24] đã chứng minh giá trị Lack of fit với $p>0,05$, $R^2>0,8$ và $CV<10\%$ thì mô hình dự đoán có tính áp dụng và thực nghiệm rất cao. Giá trị Lack of fit, R^2 , CV trong mô hình thiết kế chiết xuất polyphenol, flavonoid LSK đều phù hợp với các nghiên cứu tương tự.

Bảng 2. Phân tích các hệ số tương quan của các yếu tố đến TPC và TFC chiết xuất từ LSK

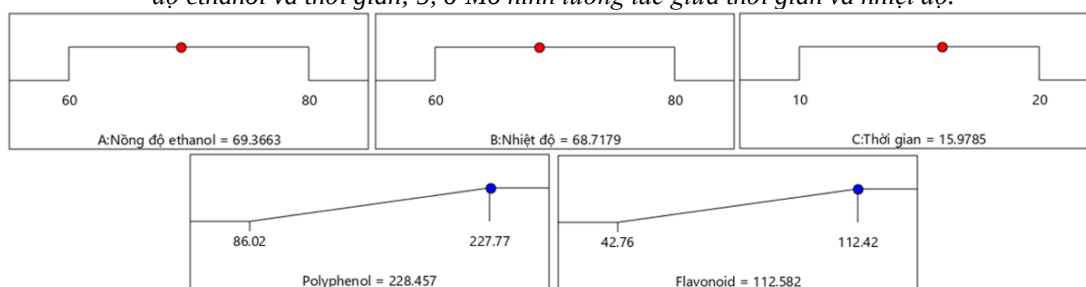
Nguồn	Phân tích ANOVA polyphenol					Phân tích ANOVA flavonoid				
	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value
Model	41247,64	9	4583,07	5709,19	<0,0001	9930,36	9	1103,37	1843,62	<0,0001
A	120,51	1	120,51	150,12	<0,0001	20,42	1	20,42	34,11	00006
B	1850,45	1	1850,45	2305,13	<0,0001	425,88	1	425,88	711,60	<0,0001
C	1513,60	1	1513,60	1885,51	<0,0001	375,79	1	375,79	627,91	<0,0001
AB	202,78	1	202,78	252,60	<0,0001	54,91	1	54,91	91,75	<0,0001
AC	0,4160	1	0,4160	0,5182	0,4949	0,3721	1	0,3721	0,6217	0,4563
BC	82,17	1	82,17	102,37	<0,0001	26,78	1	26,78	44,75	0,0003
A ²	6119,26	1	6119,26	7622,84	<0,0001	1442,81	1	1442,81	2410,78	<0,0001
B ²	23897,85	1	23897,85	29769,84	<0,0001	5906,46	1	5906,46	9869,06	<0,0001
C ²	4217,78	1	4217,78	5254,14	<0,0001	914,04	1	914,04	1527,26	<0,0001
Residual	5,62	7	0,8028			4,19	7	0,5985		
Lack of Fit	0,2113	3	0,0704	0,0521	0,9822	0,8926	3	0,2975	0,3610	0,7856
Pure Error	5,41	4	1,35			3,30	4	0,8242		
Cor Total	41253,26	16				9934,55	16			

Ghi chú: A là yếu tố nồng độ ethanol; B là yếu tố nhiệt độ siêu âm; C là yếu tố thời gian siêu âm

Các biểu đồ bề mặt đáp ứng 3D được tạo ra bằng cách cố định một yếu tố ở mức 0, đồng thời thay đổi hai yếu tố khác trong phạm vi thăm dò. Các biểu đồ 3D này đã mô tả tác động tương tác của các yếu tố đến TPC, như được hiển thị trong Hình 3. Dựa vào Hình 3.1 và Hình 3.2, biểu đồ bề mặt đáp ứng giữa nhiệt độ và nồng độ ethanol. TPC và TFC tăng cùng với nồng độ ethanol, nhiệt độ và bắt đầu giảm sau khi nồng độ ethanol đạt 70%, nhiệt độ đạt 70°C. Dựa vào Hình 3.3 đến 3.6 có thể thấy rằng việc kéo dài thời gian ly trích quá 15 phút dẫn đến việc giảm TPC, TFC.

**Hình 3.** Bề mặt đáp ứng hàm lượng polyphenol và flavonoid của cao LSK

Ghi chú: 1, 2-Mô hình tương tác giữa nhiệt độ và nồng độ ethanol; 3, 4-Mô hình tương tác giữa nồng độ ethanol và thời gian; 5, 6-Mô hình tương tác giữa thời gian và nhiệt độ.

**Hình 4.** Hàm kỳ vọng và điều kiện chiết xuất tối ưu hàm lượng polyphenol và flavonoid LSK

Các thông số chiết xuất tối ưu đạt được từ mô hình với nồng độ ethanol 69,37%, nhiệt độ 68,72°C và thời gian 15,98 phút. Với các thông số tối ưu này thì giá trị của hàm mục tiêu TPC=228,46 mg GAE/g cao chiết, TFC=112,58 mg QE/g cao chiết (Hình 4). Nghiên cứu đã kiểm định thực nghiệm phương án tốt nhất được đề ra: ethanol 69%, nhiệt độ 69°C và thời gian 15,98 phút và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi 1/30 (w/v). TPC=227,38±1,27 mg GAE/g cao chiết và TFC=113,36±2,07 mg QE/g cao chiết thu được tương đương kết quả dự đoán từ mô hình.

3.3. Hoạt tính chống oxy hóa của cao tối ưu LSK

Cao tối ưu LSK có hiệu quả trung hòa các gốc tự do ABTS^{•+}, DPPH và NO[•] với hiệu suất dao động từ 7,35±0,88% đến 86,27±0,45% ở nồng độ từ 10 đến 100 µg/mL. Vitamin C có hoạt tính trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} (EC₅₀=2,94±0,14 µg/mL), DPPH (EC₅₀=5,83±0,21 µg/mL) và NO[•] (EC₅₀=9,56±0,17 µg/mL) đều mạnh hơn cao tối ưu LSK lần lượt là 19,04, 11,81 và 8,08 lần. Theo Blois (2000), mẫu thử có giá trị EC₅₀ từ 50 đến 100 µg/mL được xem là chất chống oxy hóa mạnh [25]. Cao tối ưu LSK có hoạt tính chống oxy hóa mạnh đối với 3 gốc tự do ABTS^{•+} (EC₅₀=56,57±0,10 µg/mL), DPPH (EC₅₀=68,85±0,53 µg/mL) và NO[•] (EC₅₀=77,21±0,84 µg/mL). Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao tối ưu LSK được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Hiệu quả chống oxy hóa của cao tối ưu LSK

Nồng độ (µg/mL)	Hiệu suất (%) trung hòa các gốc tự do của cao tối ưu		
	ABTS ^{•+}	DPPH	NO [•]
10	12,69 ^f ±0,66	7,83 ^f ±0,39	7,35 ^f ±0,88
20	21,01 ^e ±0,79	15,04 ^e ±0,45	14,81 ^e ±0,58
40	36,60 ^d ±0,23	29,15 ^d ±0,53	27,10 ^d ±0,77
60	52,14 ^c ±0,50	43,25 ^c ±0,36	39,32 ^c ±0,71
80	69,39 ^b ±0,59	58,22 ^b ±0,48	51,02 ^b ±0,71
100	86,27 ^a ±0,45	72,47 ^a ±0,50	64,44 ^a ±0,33
Cao chiết và chất chuẩn	Nồng độ trung hòa 50% gốc tự do (EC ₅₀ , µg/mL)		
	ABTS ^{•+}	DPPH	NO [•]
Cao tối ưu LSK	56,57 ^a ±0,10	68,85 ^a ±0,53	77,21 ^a ±0,84
Vitamin C	2,94 ^b ±0,14	5,83 ^b ±0,21	9,56 ^b ±0,17

Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi đối với việc chiết xuất polyphenol, flavonoid từ LSK bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Kết quả cho thấy, polyphenol, flavonoid trong LSK được chiết xuất tối ưu khi sử dụng ethanol 69% ở nhiệt độ 69°C trong 15,98 phút với tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/30 (w/v). Cao tối ưu LSK có khả năng trung hòa ABTS^{•+}, DPPH và NO[•] mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Gryn'ova, D. Marshall, and S. Blanksby, "Switching radical stability by pH-induced orbital conversion," *Nature Chemistry*, vol. 5, pp. 474-481, 2013.
- [2] N. P. Visavadiya, M. L. McEwen, J. D. Pandya, P. G. Sullivan, B. J. Gwag, and J. E. Springer, "Antioxidant properties of Neu 2000 on mitochondrial free radicals and oxidative damage," *Toxicology In Vitro*, vol. 27, no. 2, pp. 788-797, 2013.
- [3] J. Y. Liang, J. M. Yuann, C. W. Cheng, H. L. Jian, C. C. Lin, and L. Y. Chen, "Blue light induced free radicals from riboflavin on *E. coli* DNA damage," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 5, no. 119, pp. 60-64, 2013.
- [4] A. M. Kabel, "Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition," *World Journal of Nutrition and Health*, vol. 2, no. 3, pp. 35-38, 2014.

- [5] Y. -J. Chiu, S. -C Chou, C. -S. Chiu, C. -P. Kao, K. -C. Wu, C. -J. Chen, and W. -H. Peng, "Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 26, no. 1, pp. 369-379, 2018.
- [6] M. Rocha, N. Apostolova, J. R. Herance, S. Rovira-Llopis, A. Hernandez-Mijares, and V. M. Victor, "Perspectives and potential applications of mitochondria-targeted antioxidants in cardiometabolic diseases and type 2 diabetes," *Medicinal Research Reviews*, vol. 34, no. 1, pp. 160-89, 2014.
- [7] O. O. Akanni, S. E. Owumi, and O. A. Adaramoye, "In vitro studies to assess the antioxidative, radical scavenging and arginase inhibitory potentials of extracts from *Artocarpus altilis*, *Ficus exasperate* and *Kigelia Africana*," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, no. 1, pp. 492-499, 2014.
- [8] B. Pradhan, S. Patra, C. Behera, R. Nayak, B. P. Jit, A. Ragusa, and M. Jena, "Preliminary Investigation of the antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activity of *Enteromorpha intestinalis* extracts," *Molecules*, vol. 26, no. 4, pp. 1171, 2021.
- [9] S. H. Nile, Y. S. Keum, A. S. Nile, S. S. Jalde, and R. V. Patel, "Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 32, no. 1, p. e22002, 2017.
- [10] T. K. Jalal, I. A. Ahmed, M. Mikail, L. Momand, S. Draman, M. L. Isa, M. S. Abdull Rasad, M. Nor Omar, M. Ibrahim, and R. Abdul Wahab, "Evaluation of antioxidant, total phenol and flavonoid content and antimicrobial activities of *Artocarpus altilis* (breadfruit) of underutilized tropical fruit extracts," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 175, no. 7, pp. 3231-43, 2015.
- [11] M. N. Ahmad, N. U. Karim, E. Normaya, B. Mat Piah, A. Iqbal, and K. H. Ku Bulat, "Artocarpus altilis extracts as a food-borne pathogen and oxidation inhibitors: RSM, COSMO RS, and molecular docking approaches," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 9566, 2020.
- [12] T. Soifoini, D. Donno, V. Jeannoda, D. D. Rakoto, A. Msahazi, S. M. M. Farhat, M. Z. Oulam, and G. L. Beccaro, "Phytochemical composition, antibacterial activity, and antioxidant properties of the *Artocarpus altilis* fruits to promote their consumption in the comoros islands as potential health-promoting food or a source of bioactive molecules for the food industry," *Foods*, vol. 10, no. 9, p. 2136, 2021.
- [13] Ministry of Health, *Vietnam Pharmacopoeia V*. Medicine Publishing House, PL13-PL14, 2018.
- [14] S. Patra, P. K. Panda, D. P. Panigrahi, P. P. Praharaj, C. S. Bhol, K. K. Mahapatra, and S. K. Bhutia, "Terminalia bellirica extract induces anticancer activity through modulation of apoptosis and autophagy in oral squamous cell carcinoma," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 136, p. 111073, 2020.
- [15] A. E. Khorasani, R. Mat Taha, S. Mohajer, and B. Banisalam, "Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from *in vivo* and *in vitro* grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover)," *BioMed Research International*, vol. 15, no. 2, pp. 1-11, 2015.
- [16] L. I. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leitao, A. S. Reis, T. dos Santos, and C. S. Coube, "Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method," *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 2, pp. 127-130, 2001.
- [17] M. A. Ebrahimzadeh, S. F. Nabavi, and S. M. Nabavi, "Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. flower," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 12, no. 5, pp. 447-450, 2009.
- [18] T. L. Miron, M. Plaza, G. Bahrim, E. Ibáñez, and M. Herrero, "Chemical composition of bioactive pressurized extracts of *Romanian aromatic plants*," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 30, pp. 4918-4927, 2011.
- [19] A. A. Jovanović, V. B. Đorđević, G. M. Zdunić, D. S. Pljevljakušić, K. P. Šavikin, D. M. Godevac, and B. M. Bugarski, "Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques," *Separation and Purification Technology*, vol. 179, pp. 369-380, 2017.
- [20] M. B. Hossain, C. Barry-Ryan, A. B. Martin-Diana, and N. P. Brunton, "Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology," *Food Chemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 339-346, 2011.
- [21] A. Mustafa and C. Turner, "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 703, no. 1, pp. 8-18, 2011.

-
- [22] J. Lai, H. Wang, D. Wang, F. Fang, F. Wang, and T. Wu, "Ultrasonic extraction of antioxidants from Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit using response surface methodology and their characterization," *Molecules*, vol. 19, no. 7, pp. 9019-9032, 2014.
- [23] I. Tomaz, L. Maslov, D. Stupić, D. Preiner, D. Ašperger, and J. Karoglan Kontić, "Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology," *Phytochemical Analysis*, vol. 27, no. 1, pp. 13-22, 2016.
- [24] H. Cui, T. Lu, M. Wang, X. Zou, Y. Zhang, X. Yang, Y. Dong, and H. Zhou, "Flavonoids from *Morus alba* L. leaves: Optimization of extraction by response surface methodology and comprehensive evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and inhibition of α -amylase activities through analytical hierarchy process," *Molecules*, vol. 24, no. 13, pp. 2398, 2019.
- [25] M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of stable free radicals," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199-2000, 1958.