

OPTIMIZATION OF POLYPHENOL, FLAVONOID EXTRACTING PROGRESS AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *MORUS ALBA* L. LEAF EXTRACTS COLLECTED IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Doan Thi Ai Nghia*, Le Trong Nhan, Dang Thi Quynh Hoa, Tran Xuan Phu, Pham Thi Hien Thu
Hue University of Medicine and Pharmacy - Hue University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/10/2023 Revised: 05/3/2024 Published: 11/3/2024 KEYWORDS <i>Morus alba</i> L. Optimization Polyphenol Flavonoid Antioxidant activity	<i>Morus alba</i> L. leaves contain many biologically active compounds such as phenolics, alkaloids, polysaccharides, vitamins. Extracts rich in polyphenols and flavonoids are important in creating active products, especially antioxidant. The aim of this study was to create rich polyphenol and flavonoid extract and to evaluate the antioxidant activity of the extracts at the optimal conditions from <i>Morus alba</i> L. leaves collected in Thua Thien Hue. The response surface method (RSM) was applied to study the effect of extraction factors on polyphenol (TPC) and flavonoid (TFC) content. The antioxidant activity <i>in vitro</i> was assessed through the DPPH free radical scavenging. The optimal conditions for extracting <i>M.alba</i> L. solvent concentration 80%; solvent/medicinal ratio 34 (mL/g); temperature 49 °C; time 49 minutes. At optimal conditions, TPC and TFC were obtained at 170.06 ± 1.97 (mg Gallic Acid/g dry matter) and 26.11 ± 0.49 (mg Rutin/g dry matter) respectively. The IC₅₀ value of the extract at the optimized conditions was recorded as 42.07 µg/mL.

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT POLYPHENOL, FLAVONOID VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA LÁ DÂU TẮM THU HÁI TẠI THỪA THIÊN HUẾ

Đoàn Thị Ái Nghĩa*, Lê Trọng Nhân, Đặng Thị Quỳnh Hoa, Trần Xuân Phú, Phạm Thị Hiền Thu
Trường Đại học Y Dược - ĐH Huế

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/10/2023 Ngày hoàn thiện: 05/3/2024 Ngày đăng: 11/3/2024 TỪ KHÓA Lá dâu tằm; Tối ưu hóa; Polyphenol; Flavonoid; Hoạt tính chống oxy hóa	Lá cây dâu tằm (<i>Morus alba</i> L.) có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, alkaloid, polysaccharit, vitamin. Dịch chiết giàu polyphenol và flavonoid có ý nghĩa quan trọng trong việc tạo ra sản phẩm giàu hoạt tính, đặc biệt là hoạt tính chống oxy hóa. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm chiết xuất dịch chiết giàu polyphenol, flavonoid và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết từ lá cây dâu tằm thu hái tại Thừa Thiên Huế. Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) được áp dụng để kiểm tra ảnh hưởng của các yếu tố chiết xuất đến hàm lượng polyphenol (TPC) và flavonoid (TFC). Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH. Điều kiện tối ưu chiết xuất lá dâu tằm: nồng độ dung môi 80%; tỷ lệ dung môi/dược liệu 34 (mL/g); nhiệt độ chiết xuất 49°C; thời gian chiết xuất 49 phút. Tại điều kiện chiết tối ưu, hàm lượng TPC và TFC thu được lần lượt là $170,06 \pm 1,97$ (mg Gallic Acid/g chất khô) và $26,11 \pm 0,49$ (mg Rutin/g chất khô). Khả năng chống oxy hóa của dịch chiết ở điều kiện tối ưu có giá trị IC₅₀ = 42,07 µg/mL.

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8954>

* Corresponding author. Email: dtanghia@huemed-univ.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây dâu tằm (*Morus alba* L.) được trồng khá phổ biến ở nước ta vừa được dùng trong thực phẩm, vừa có thể làm thuốc trị bệnh, bồi bổ cơ thể. Lá dâu được dùng để chữa sốt, cho ra mồ hôi, cảm mạo, trừ đờm, cao huyết áp, làm sáng mắt,... [1]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, lá dâu tằm có chứa nhiều hợp chất hoạt chất sinh học như hợp chất phenolic, alkaloid, polysaccharit, vitamin [2] và có mối tương quan chặt chẽ giữa hàm lượng polyphenol với hoạt tính chống oxy hóa [3], [4]. Nghiên cứu chiết xuất được cao thuốc giàu polyphenol có ý nghĩa quan trọng trong việc tạo ra sản phẩm giàu hoạt tính, đặc biệt là hoạt tính chống oxy hóa.

Tối ưu hóa quy trình chiết xuất để thu nhận được các hợp chất giàu hoạt tính từ thực vật là một vấn đề được quan tâm trong nghiên cứu và sản xuất sản phẩm từ dược liệu. Trong số những phương pháp quy hoạch thực nghiệm hiện đại, phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology- RSM) với sự hỗ trợ của các phần mềm xử lý số liệu đã trở thành một công cụ hữu ích giúp các chuyên gia thực hiện nghiên cứu các quá trình tối ưu hóa đa nhân tố, nhằm tiết kiệm thời gian, chi phí [5].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng trong tối ưu hóa các quy trình chiết xuất, sản xuất sản phẩm từ lá dâu tằm [6]-[8]. Tại Việt Nam, có một nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất trên quả dâu tằm [9]; chưa có nghiên cứu nào áp dụng phương pháp bề mặt đáp ứng để tối ưu hóa thành phần polyphenol và flavonoid trên lá dâu tằm. Do đó, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu góp phần cung cấp những cơ sở tiền đề cho việc ứng dụng nguyên liệu lá dâu tằm thu hái khá dễ tại địa phương trong chăm sóc sức khỏe.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá dâu tằm (*Morus alba* L.) họ Moraceae được thu hái tại Thừa Thiên Huế vào tháng 7/2022. Lá dâu tằm được cắt nhỏ và sấy ở nhiệt độ 50°C đến khô, xay thành bột và rây qua rây có mắt lưới $\phi = 2$ mm để bột có kích thước đồng nhất. Bột nguyên liệu sau khi xử lý được hàn kín và bảo quản ở nhiệt độ thường.

Các dung dịch mẫu thử trong nghiên cứu thu được bằng phương pháp chiết xuất siêu âm hỗn hợp bột lá dâu tằm và dung môi ở các điều kiện khác nhau; sau đó ly tâm dịch chiết bằng thiết bị máy ly tâm (Jiangsu Zhengji, Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quá trình nghiên cứu được tuân tự thực hiện theo các bước sau: (1) khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất, từ đó lựa chọn giới hạn khảo sát và điểm trung tâm của các yếu tố trên (biến độc lập); (2) thiết kế và thực hiện mô hình thí nghiệm tối ưu hóa; (3) phân tích số liệu thực nghiệm; (4) chiết xuất lá dâu trong điều kiện tối ưu, so sánh kết quả giữa mô hình và thực nghiệm; (5) xác định TPC, TFC và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết lá dâu tằm theo điều kiện chiết xuất tối ưu [6], [10], [11].

2.2.1. Khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất

Khảo sát lần lượt sự ảnh hưởng của 4 yếu tố: nồng độ ethanol, tỉ lệ dung môi ethanol/dược liệu (mL/g), nhiệt độ chiết xuất (°C) và thời gian chiết xuất (phút) đến TPC và TFC của dịch chiết lá dâu tằm. Tại mỗi bước thí nghiệm, thay đổi giá trị của yếu tố cần khảo sát và cố định các thông số còn lại; xác định TPC và TFC; từ đó chọn yếu tố thích hợp để sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo. Các nồng độ dung môi được khảo sát là ethanol 0; 20; 40; 60; 80 và 99,5 (% v/v). Các tỷ lệ dung môi/dược liệu được khảo sát là 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 và 40 (mL/g). Các mức nhiệt độ được khảo sát là 30, 40, 50, 60 và 70°C. Các mốc thời gian chiết xuất được khảo sát là 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50 và 60 phút.

2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng

Hàm lượng phenolic tổng được xác định theo phương pháp của Singleton và cộng sự (1999) với một vài hiệu chỉnh nhỏ; sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu; dựa trên đường chuẩn acid Gallic [12].

Hỗn hợp phản ứng gồm 0,2 mL dịch chiết đã pha loãng ở nồng độ thích hợp trộn với 0,8 mL nước cất trong ống nghiệm trước khi thêm 1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Lắc đều, sau 5 phút cho thêm 2,5 mL Na_2CO_3 7,5%. Tiếp tục lắc đều và giữ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 760 nm. Mẫu trắng: tiến hành giống mẫu thử nhưng thay thế dịch chiết mẫu bằng nước cất. Hàm lượng phenolic tổng (mg GAE/g chất khô) được tính theo công thức (1):

$$\text{Hàm lượng phenolic tổng} = \frac{C \times 22,5 \times n \times V}{m \times 1000} \quad (1)$$

Trong đó, C: nồng độ acid Gallic tính theo phương trình đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); n: hệ số pha loãng trước khi thực hiện phép đo màu; V: thể tích của dịch chiết mẫu (mL); m: khối lượng của bột lá dâu (g).

2.2.3. Phương pháp định lượng flavonoid toàn phần

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm so màu nhôm clorua; dựa trên đường chuẩn Rutin [13].

Hỗn hợp phản ứng gồm 2 mL dịch chiết đã pha loãng ở nồng độ thích hợp và 2 mL AlCl_3 2%, lắc đều và để yên trong tối 10 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 430 nm. Mẫu trắng: gồm 2 mL mẫu ở nồng độ tương ứng và 2 mL methanol. Hàm lượng flavonoid tổng (mg RU/g chất khô) được tính theo công thức (2):

$$\text{Hàm lượng flavonoid tổng} = \frac{C \times 2 \times n \times V}{m \times 1000} \quad (2)$$

Trong đó, C: nồng độ Rutin tính theo phương trình đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); n: hệ số pha loãng trước khi thực hiện phép đo màu; V: thể tích của dịch chiết mẫu (mL); m: khối lượng của bột dược liệu (g).

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

Hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo phương pháp của Waleed Aboshora và cộng sự (2014) với một vài hiệu chỉnh nhỏ [14], [15]. Nguyên tắc của phương pháp dựa trên sự thay đổi độ hấp thụ quang của hỗn hợp mẫu thử và dung dịch thuốc thử 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) - là một gốc tự do bền, màu tím, có cực đại hấp thụ tại bước sóng 517 nm [16].

Hỗn hợp phản ứng gồm 2 mL dung dịch DPPH 0,135 mM và 2 mL dung dịch thử ở các nồng độ 58; 29; 14,5; 7,25 và 3,625 $\mu\text{g/mL}$, lắc đều và để yên trong tối 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 517 nm. Đối chứng dương trong thí nghiệm là Quercetin, được tiến hành tương tự như mẫu thử. Mẫu trắng là methanol. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH được xác định theo công thức (3):

$$\% \text{ ức chế DPPH} = 100 \times \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \quad (3)$$

Trong đó, A_c : độ hấp thụ quang học của mẫu chứng gồm có DPPH và MeOH, A_s : độ hấp thụ quang học của mẫu thử gồm có DPPH và dịch chiết. Kết quả báo cáo bởi phần trăm khả năng trung hòa gốc tự do DPPH.

Giá trị IC_{50} được xác định là nồng độ tối thiểu của dịch chiết trung hòa được 50% lượng DPPH và được tính dựa vào đường tuyến tính giữa nồng độ của dịch chiết và % DPPH bị trung hòa.

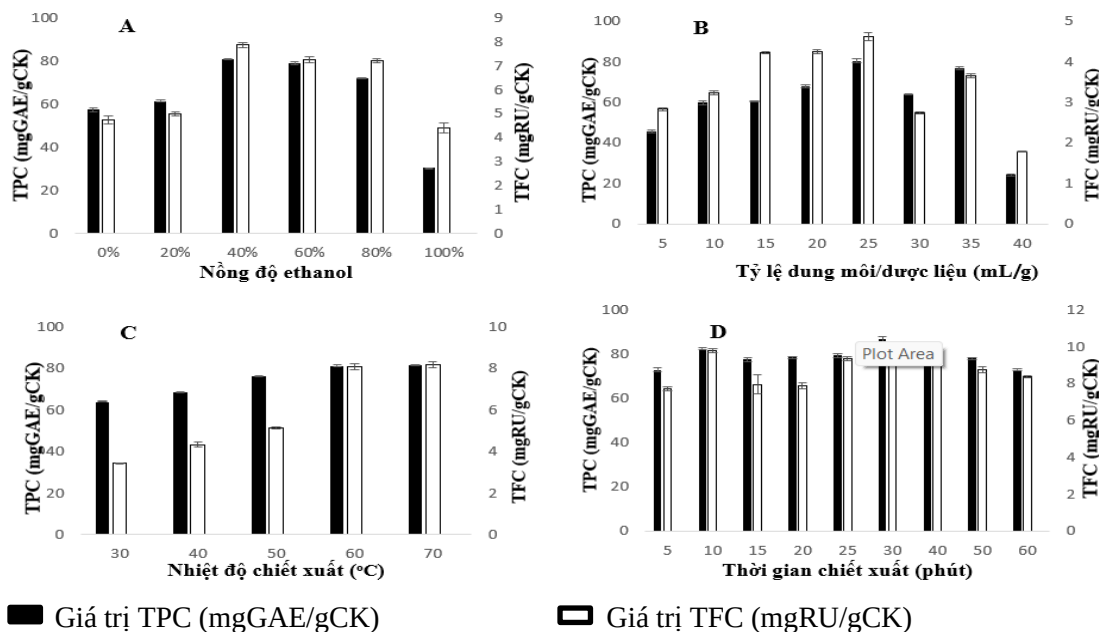
2.2.5. Xử lý thống kê

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và SPSS 20.0. Mô hình thí nghiệm tối ưu hóa được thiết kế bằng mô hình *Box-Behnken* trên phần mềm Design Expert 13.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất

Kết quả khảo sát đơn biến các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình chiết xuất được thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol (A), tỷ lệ dung môi/dược liệu (B), nhiệt độ chiết xuất (C), thời gian chiết xuất đến (D) hàm lượng phenolic tổng và flavonoid toàn phần

Trong khảo sát nồng độ dung môi, khi tăng nồng độ dung môi từ 0-40% thì hàm lượng TPC và TFC tăng đáng kể. Ở các nồng độ 40; 60 và 80%, hàm lượng TPC và TFC đạt cao nhất và khác biệt không có ý nghĩa thống kê; ở nồng độ 100% thì hàm lượng TPC và TFC giảm xuống. Như vậy, khoảng nồng độ ethanol từ 0-80% và điểm trung tâm là 40% được lựa chọn để khảo sát.

Trong khảo sát tỷ lệ dung môi/dược liệu, tỷ lệ 5-25 mL/g cho giá trị TPC và TFC tăng đáng kể; khi tăng từ tỷ lệ 35 lên 40 mL/g thì hàm lượng TPC và TFC giảm xuống. Lựa chọn miền khảo sát là 5 - 35 mL/g với điểm 20 mL/g là điểm trung tâm.

Trong khảo sát nhiệt độ, khi tăng nhiệt độ từ 30-60°C hàm lượng TPC và TFC tăng lên đáng kể; trong khi giá trị này ở 70°C so với 60°C khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Trong giới hạn của thiết bị nghiên cứu, lựa chọn miền khảo sát là 30-60°C; nhiệt độ 45°C là điểm trung tâm.

Trong khảo sát thời gian chiết, tại mốc thời gian 30 phút hàm lượng TPC và TFC thu được là cao nhất. Khi tăng thời gian chiết xuất từ 50 lên 60 phút, hàm lượng TPC giảm và TFC thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Thời gian từ 10-50 phút và điểm trung tâm là 30 phút được lựa chọn là miền khảo sát.

Kết thúc bước khảo sát các yếu tố, nghiên cứu đã giới hạn được vùng khảo sát của các yếu tố, sao cho điểm mà hàm lượng TPC và TFC có giá trị cao nhất là giá trị trung tâm hoặc nằm trong vùng khảo sát. Vùng khảo sát và điểm trung tâm của các yếu tố khảo sát được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Giá trị điểm trung tâm đưa vào mô hình tối ưu hóa

Yếu tố khảo sát	Ký hiệu	Vùng khảo sát	Giá trị trung tâm
Nồng độ ethanol	A	0-80 (%)	40 (%)
Tỷ lệ dung môi/dược liệu	B	5-35 (mL/g)	20 (mL/g)
Nhiệt độ chiết xuất	C	30-60 (°C)	45 (°C)
Thời gian chiết xuất	D	10-50 (phút)	30 (phút)

3.2. Kết quả tối ưu hóa quá trình chiết xuất

Mô hình thiết kế thí nghiệm Box-Behnken được thực hiện trên phần mềm Design Expert 13. Mô hình bao gồm 27 đơn vị thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm trung tâm. Tiến hành thí nghiệm chiết xuất lá Dâu tằm trong 27 điều kiện thí nghiệm đã được thiết kế, Giá trị TPC và TFC thu được được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Mô hình thí nghiệm theo Box-Behnken và kết quả hàm lượng phenolic tổng và flavonoid toàn phần

STT	Biến độc lập				TPC	TFC	STT	Biến độc lập				TPC	TFC
	A	B	C	D				A	B	C	D		
1	40	20	30	50	71,37	8,87	15	40	20	45	30	72,85	10,03
2	40	35	30	30	93,24	8,34	16	40	5	45	50	72,31	8,33
3	40	20	30	10	71,31	5,01	17	40	20	45	30	85,12	10,36
4	80	20	30	30	97,57	13,1	18	0	20	45	10	72,49	6,81
5	0	20	30	30	67,19	6,1	19	80	20	45	50	169,87	18,96
6	40	5	30	30	23,47	5,82	20	0	35	45	30	41,59	6,94
7	80	35	45	30	151,12	26,09	21	80	20	45	10	146,89	17,65
8	0	20	45	50	72,99	6,82	22	80	20	60	30	123,35	15,98
9	40	20	45	30	72,57	8,69	23	40	35	60	30	51,76	11,75
10	0	5	45	30	69,74	12,19	24	0	20	60	30	40,91	4,69
11	40	35	45	50	106,35	14,41	25	40	20	60	50	97,12	6,71
12	40	5	45	10	68,56	9,95	26	40	5	60	30	68,69	9,47
13	80	5	45	30	80,94	15,81	27	40	20	60	10	70,07	7,31
14	40	35	45	10	91,99	8,01							

Sự phù hợp và có ý nghĩa của mô hình được đánh giá qua phân tích ANOVA (phân tích phương sai) và các chỉ số tương quan (bảng 3). Sự có ý nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi Fisher F-test, với các giá trị $p < 0,05$ cho biết các hệ số hồi quy có ý nghĩa.

Bảng 0. Kết quả phân tích ANOVA với hàm lượng phenolic tổng và flavonoid toàn phần

Nguồn	Kết quả phân tích ANOVA với hàm lượng phenolic tổng					Kết quả phân tích ANOVA với hàm lượng flavonoid toàn phần				
	Tổng bình phương	Độ bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Tổng bình phương	Độ bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình	27652,92	11	2513,90	31,11	<0,0001	622,70	11	56,61	41,72	<0,0001
A	13657,43	1	13657,43	169,02	<0,0001	341,76	1	341,76	251,84	<0,0001
B	1933,78	1	1933,78	23,93	0,0002	16,26	1	16,26	11,98	0,0035
C	64,27	1	64,27	0,7943	0,3866	6,26	1	6,26	4,62	0,0484
D	393,34	1	393,34	4,87	0,0434	7,30	1	7,30	5,38	0,0349
AB	2416,86	1	2416,86	29,91	<0,0001	60,30	1	60,30	44,43	<0,0001
AC	677,53	1	677,53	8,38	0,0111	4,60	1	4,60	3,39	0,0854
BC	1879,22	1	1879,22	23,26	0,0002	16,08	1	16,08	11,85	0,0036
A ²	1967,11	1	1967,11	24,34	0,0002	4,97	1	4,97	3,66	0,0749
B ²	312,74	1	312,74	3,87	0,0679	78,76	1	78,76	58,04	<0,0001
C ²	198,15	1	198,15	11,36	0,0042	20,97	1	20,97	15,45	0,0013
D ²	1414,77	1	1414,77	17,51	0,0008	33,86	1	33,86	24,95	0,0002
Số dư	1212,08	15	80,81			20,36	15	1,36		
Không tương thích	1109,31	13	85,33	1,66	0,4378	18,79	13	1,45	1,85	0,4054
Sai số thuần	102,77	2	51,39			1,56	2	0,7822		
$R^2 = 0,9580$;						$R^2 = 0,9683$;				
R^2 hiệu chỉnh = 0,9272; R^2 dự đoán = 0,8698						R^2 hiệu chỉnh = 0,9451; R^2 dự đoán = 0,8814				

Kết quả phân tích mức độ tin cậy và phương sai ở bảng 3 cho thấy giá trị của mô hình Fisher F-test lần lượt là 31,11 và 41,72; giá trị xác suất $p < 0,0001$ đã chứng tỏ mô hình thí nghiệm được thiết lập với ý nghĩa thống kê cao. Các giá trị hệ số tương quan R^2 lần lượt tương ứng với 2 thông

số đầu ra là (0,9580; 0,9683) và giá trị không tương thích (lack of fit) của mô hình lần lượt là (0,4378; 0,4054) ($p > 0,05$) cho thấy sự tương thích của mô hình so với thực nghiệm.

Phương trình hồi quy cuối cùng biểu diễn mối quan hệ giữa 2 thông số đầu ra và các biến của mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng Box-Behnken cho quá trình chiết xuất được mô tả trong phương trình (1) và (2).

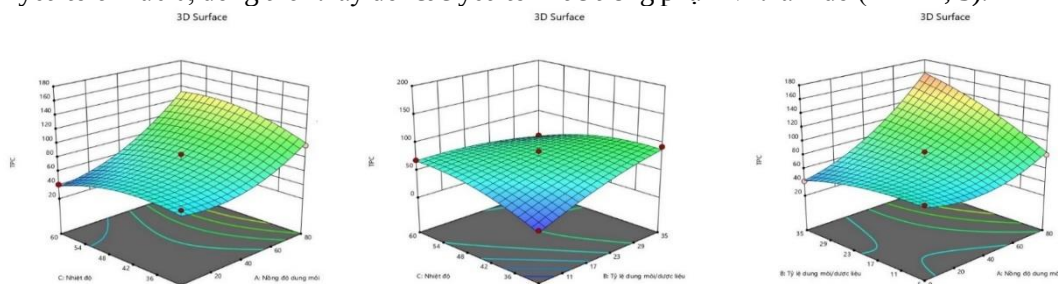
TPC = $-80,07517 - 1,91231A + 4,90393B + 6,46159C - 2,15680D + 0,040968AB + 0,021691AC - 0,096333BC + 0,012003A^2 - 0,034034B^2 - 0,058314C^2 + 0,040718D^2$
(phương trình 1)

TFC = $9,14 + 5,34A + 1,16B + 0,07225C + 0,7800D + 3,88AB + 1,07AC + 2,00BD - 1,11CD + 3,62A^2 + 1,87B^2 - 2,38C^2$ (phương trình 2)

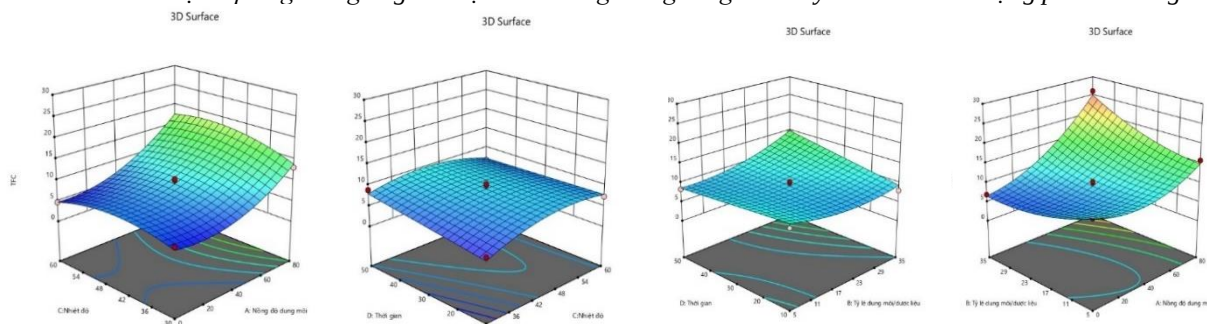
Trong đó: TPC là hàm lượng phenolic tổng (mgGAE/gCK); TFC là hàm lượng flavonoid toàn phần (mgRU/gCK); A là nồng độ ethanol (%); B là tỷ lệ dung môi/được liệu (mL/g); C là nhiệt độ chiết xuất ($^{\circ}\text{C}$); D là thời gian chiết xuất (phút).

Phương trình (1) và (2) thể hiện được sự tương thích của các giá trị thực nghiệm và dự đoán với hệ số tương quan cao ($R^2 = 0,9580$ và $R^2 = 0,9683$).

Sử dụng đồ thị bề mặt đáp ứng 3D để quan sát sự ảnh hưởng tương tác của các yếu tố đến hàm lượng phenolic tổng và flavonoid toàn phần. Các đồ thị bề mặt đáp ứng 3D được tạo ra bằng cách cố định hai yếu tố ở mức 0, đồng thời thay đổi các yếu tố khác trong phạm vi thăm dò (Hình 2, 3).



Hình 1. Bề mặt đáp ứng tương ứng thể hiện ảnh hưởng tương tác giữa các yếu tố đến hàm lượng phenolic tổng



Hình 3. Bề mặt đáp ứng (A.2 – D.2) thể hiện ảnh hưởng tương tác giữa các yếu tố đến hàm lượng flavonoid toàn phần

Từ dữ liệu của quá trình tối ưu hóa dựa trên mô hình bề mặt đáp ứng, các điều kiện chiết xuất được tối ưu như sau: nồng độ dung môi 79,53%; tỷ lệ dung môi/được liệu 33,85 (mL/g); nhiệt độ chiết xuất 48,66 $^{\circ}\text{C}$; thời gian chiết xuất 48,87 phút cho hàm lượng TPC_{max} tiên đoán là 174,52 (mgGAE/gCK); hàm lượng TFC_{max} tiên đoán là 26,69 (mgRU/gCK).

Để phù hợp với điều kiện thiết bị của phòng thí nghiệm, trước khi tiến hành kiểm chứng thực nghiệm, các giá trị khảo sát thực tế được hiệu chỉnh lại như sau: nồng độ dung môi 80%; tỷ lệ dung môi/được liệu 34 (mL/g); nhiệt độ chiết xuất 49 $^{\circ}\text{C}$; thời gian chiết xuất 49 phút. Tiến hành chiết xuất lá dâu tằm với điều kiện như trên thu được kết quả hàm lượng TPC và TFC lần lượt là

170,06 $\pm$ 1,97 (mgGAE/gCK) và 26,11 $\pm$ 0,49 (mgRU/gCK), khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 95% so với giá trị dự đoán.

Bước khảo sát đơn biến có ý nghĩa trong việc xác định vùng khảo sát cho mô hình tối ưu hóa, là một bước trong tiến trình thực hiện tối ưu hóa bằng mô hình bề mặt đáp ứng; các điều kiện cố định trong khảo sát đơn biến không trùng với các điều kiện chiết trong ma trận của mô hình tối ưu hóa. Điều kiện tối ưu hóa được đề xuất từ mô hình là sản phẩm của quá trình tương tác đồng thời của bốn biến độc lập đến hai biến phụ thuộc là giá trị hàm lượng TPC và TFC.

3.3. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*

Tác dụng chống oxy hóa được thể hiện ở khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và được biểu thị bằng các giá trị IC₅₀. Phương trình biểu hiện sự tuyến tính giữa nồng độ mẫu và phần trăm ức chế DPPH của cao lá dâu tằm và chứng dương Quercetin lần lượt là $Y=0,9756X + 8,976$ ($R^2=0,9876$) và $Y=9,686X + 13,289$ ($R^2=0,9746$). Giá trị IC₅₀ suy ra từ phương trình tuyến tính của cao lá dâu tằm và đối chứng dương Quercetin lần lượt là 42,07 μ g/mL và 3,79 μ g/mL.

Trong nghiên cứu của Dong-Seo và cộng sự (năm 2014), khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của lá dâu tằm thể hiện qua giá trị IC₅₀ dao động từ 139-584 μ g/mL phụ thuộc vào vùng thu hái của nguyên liệu [17]. Trong nghiên cứu của Ines Thabti và cộng sự (năm 2011), khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của lá dâu tằm có giá trị IC₅₀ là 119,16 μ g/mL [18]. So với các công bố trên, cao lá dâu tằm thu được ở điều kiện chiết xuất tối ưu của nghiên cứu này thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* mạnh hơn đặt ra một giả thuyết rằng hoạt tính chống oxy hóa khác nhau có thể do nguyên liệu thu hái ở các vùng thổ nhưỡng khác nhau và điều kiện thực hiện thí nghiệm hoặc có thể đặt ra một giả thuyết rằng ở các nghiên cứu trên cao mẫu chưa nghiên cứu chiết xuất ở điều kiện tối ưu.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu lần đầu tiên áp dụng phương pháp bề mặt đáp ứng để tối ưu hóa thành phần polyphenol và flavonoid trên lá dâu tằm thực hiện ở Việt Nam. Điều kiện chiết xuất tối ưu đề xuất từ nghiên cứu này là: chiết xuất siêu âm, nồng độ dung môi ethanol 80%; tỷ lệ dung môi/dược liệu 34 (mL/g); nhiệt độ chiết xuất 49°C; thời gian chiết xuất 49 phút. Tiến hành chiết xuất lá dâu tằm với điều kiện như trên thu được kết quả hàm lượng TPC và TFC lần lượt là 170,06 $\pm$ 1,97 (mgGAE/gCK) và 26,11 $\pm$ 0,49 (mgRU/gCK). Cao chiết lá dâu tằm ở điều kiện tối ưu thể hiện khả năng chống oxy hóa *in vitro* với giá trị IC₅₀ là 42,07 μ g/mL.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Quỹ Khoa học công nghệ của Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế đã hỗ trợ kinh phí thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. T. Do, *Vietnamese medicinal plants and herbs*. Medical Publishing, 2004, pp. 720-723.
- [2] Z. Wang, C. Tang, F. Dai, G. Xiao, and G. Luo, "HPLC determination of phenolic compounds in different solvent extracts of mulberry leaves and antioxidant capacity of extracts," *Int. J. Food Prop.*, vol. 24, pp. 544-552, Mar. 2021, doi: 10.1080/10942912.2021.1904980.
- [3] M. T. Truong, L. T. Nguyen, L. A. Pham, and T. K. Hoang, "Total polyphenol content, free radical scavenging, alpha-glucosidase inhibition capacity, the efficacy in controlling blood glucose of diabetic rats of the mixture VOS extracted from the leaves of *Cleistocalyx operculatus*, *Psidium guajava* and *Nelumbo nucifera*," *Journal of Medicine and Pharmacy*, vol. 3, no. 2, p. 50, April 2013.
- [4] D. X. Nguyen and T. A. Nguyen, "Screening of plants with antioxidant activity and application in fishery processing," *Cantho Journal of medicine and Pharmacy*, vol. 28, pp. 59-68, 2013.
- [5] J. Milán-Carrillo, A. Montoya-Rodríguez, R. Gutiérrez-Dorado, X. Perales-Sánchez, and C. Reyes-Moreno, "Optimization of Extrusion Process for Producing High Antioxidant Instant Amaranth Flour

- Using Response Surface Methodology,” *Appl. Math.*, vol. 03, no. 10, pp. 1516-1525, 2012, doi: 10.4236/am.2012.330211.
- [6] M. Radojković, Z. Zekovic, S. Jokic, and S. Vidovic, “Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM),” *Romanian Biotechnol. Lett.*, vol. 17, pp. 7197-7310, Jan. 2012.
- [7] Q. Yuan *et al.*, “Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 128, pp. 52-62, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.028.
- [8] H. Cui *et al.*, “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, p. 2398, Jun. 2019, doi: 10.3390/molecules24132398.
- [9] T. T. Vo, T. K. Phan, T. C. T. Nguyen, T. D. Nguyen, P. H. Le, and T. T. T. Truong, “Optimization of enzyme pectinase rate and time extract of mulberry (*Morus alba* L. *Morus acidosa*),” *Vietnam Journal of Science and Technology*, no. 2, pp. 43-49, Mar. 2023
- [10] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira, “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry,” *Talanta*, vol. 76, no. 5, pp. 965-977, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [11] H. Cui *et al.*, “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, Art. no. 2389, Jan. 2019, doi: 10.3390/molecules24132398.
- [12] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent,” *Methods Enzymol.*, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- [13] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, “The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals,” *Food Chem.*, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.
- [14] O. T. Asekun, S. O. Okoh, O. B. Familoni, and A. J. Afolayan, “Chemical Profiles and Antioxidant Activity of Essential Oils Extracted from the Leaf and Stem of *Parkia biglobosa* (Jacq) Benth,” *Res. J. Med. Plants*, vol. 7, no. 2, pp. 82-91, Jul. 2013, doi: 10.17311/rjmp.2013.82.91.
- [15] W. Aboshora, “Effect of Extraction Method and Solvent Power on Polyphenol and Flavonoid Levels in *Hyphaene Thebaica* L Mart (Arecaceae) (Doum) Fruit, and its Antioxidant and Antibacterial Activities,” *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 13, no. 12, pp. 2057-2063, Dec. 2014.
- [16] P. Q. D. Nguyen, L. T. K. Nguyen, N. A. T. Doan, D. V. Tong, and T. T. T. Nguyen, “Chemical composition and antioxidant activity of extracts from the aerial parts of *Glycosmis parviflora* (Sims) Little,” *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 226, no. 14, pp. 230-237, Oct. 2021, doi: 10.34238/tnu-jst.4615.
- [17] D.-S. Kim, Y. Kang, W. Jin, Y.-Y. Sung, G. Choi, and H. Kim, “Antioxidant activities and polyphenol content of *Morus alba* leaf extracts collected from varying regions,” *Biomed. Rep.*, vol. 2, pp. 675-680, Sep. 2014, doi: 10.3892/br.2014.294.
- [18] I. Thabti, N. Marzougui, W. Elfalleh, and A. Ferchichi, “Antioxidant composition and antioxidant activity of white (*Morus alba* L.), black (*Morus nigra* L.) and red (*Morus rubra* L.) mulberry leaves,” *Acta Bot. Gallica Bull. Société Bot. Fr.*, vol. 158, pp. 205-214, Jun. 2011, doi: 10.1080/12538078.2011.10516267.