

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH LY TRÍCH
HỢP CHẤT THỰC VẬT TỪ HOA ĐẬU BIẾC (*Clitoria
ternatea* L.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT
- PHƯƠNG ÁN CẤU TRÚC CÓ TÂM
RESEARCH ON OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION
PROCEDURE OF SECONDARY METABOLITES FROM BLUE
PEA FLOWER (*Clitoria Ternatea* L.) USING THE RESPONSE
SURFACE METHODOLOGY - CENTRAL COMPOSITE DESIGN**

TRƯƠNG VĂN XẠ^{1*}, NGUYỄN THỊ HUỲNH NHƯ²,
BÙI XUÂN TIẾN², TRẦN KIM THOA¹

¹ Khoa Khoa học Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học SPKT Vĩnh Long

² Lớp Đại học Công nghệ Sinh học năm 2018, Trường Đại học SPKT Vĩnh Long

Email *: xatv@vlute.edu.vn

Nhận bài (received): 03/3/2022; Phản biện (revised): 28/3/2022; Chấp nhận (accepted): 12/4/2022

TÓM TẮT

Hoa đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) là cây dược liệu chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học quý giúp hỗ trợ phòng và điều trị một số bệnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của các điều kiện trích ly bao gồm: nồng độ dung môi ethanol, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu và thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD), các giá trị tối ưu để trích ly polyphenol tổng và flavonoid tổng như sau: nồng độ ethanol là 60%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 1:1 (v/w) và thời gian trích ly lần lượt là 96 giờ và 48 giờ. Đối với trích ly alkaloid tổng như sau: nồng độ ethanol là 60%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 2:1 (v/w) và thời gian trích ly là 96 giờ. Tại điều kiện chiết tối ưu, hàm lượng polyphenol, flavonoid và alkaloid thu được lần lượt là 270,308 µg GAE/ml dịch chiết, 331,410 µg QE /ml dịch chiết và 39,118 µg AE/ml dịch chiết. Kết quả cho thấy dịch chiết từ hoa đậu biếc chứa lượng lớn các hợp chất dược liệu có tiềm năng sử dụng làm chất chống oxy hóa tự nhiên.

Từ khóa: Hoa đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.), hợp chất thực vật, phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM), phương án cấu trúc có tâm (CCD).

ABSTRACT

Blue pea flower (Clitoria ternatea L.) is a medicinal plant containing many secondary metabolites that help prevent and treat diseases. This study aims at identifying the optimal values of different factors directly influencing the polyphenols, flavonoids, and alkaloids: ethanol concentration, liquid/solid ratio, extraction duration. These three factors were subsequently optimized using the response surface methodology - central

composite design. Results showed that total polyphenol, total flavonoid have the most optimal 60% ethanol, 1:1 liquid/solid ratio and the extraction time of 96 hours and 48 hours, respectively. Total alkaloids have the most optimal 60% ethanol, 2:1 liquid/solid ratio and the extraction time of 96 hours. In optimized, total polyphenols 270,308 μg GAE/ml extract, total flavonoids 331,410 μg QE /ml extract and total alkaloids 39,118 μg AE/ml extract. Blue pea flower can be used as a material source in extracting secondary metabolites which contain antioxidant activity..

Keywords: Blue pea flower (*Clitoria ternatea* L.), secondary metabolites, Response Surface Methodology – RSM, Central Composite Design - CCD.

1. GIỚI THIỆU

Hoa đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) còn được biết đến với tên gọi bông biếc hay đậu hoa tím thuộc họ đậu (Fabaceae) [1]. Delphinidin là anthocyanin chính tạo ra màu xanh lam đậm đến tím của loài hoa này [2]. Một số hợp chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng có tác dụng hỗ trợ phòng và trị bệnh có trong hoa đậu biếc được kể đến như flavonoid, flavonol, anthocyanin, polyphenol, alkaloid [3, 4, 5]. Ở Việt Nam, hoa đậu biếc thường được dùng làm thức uống và tạo màu thực phẩm [6]. Bên cạnh đó, hoa đậu biếc còn tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh cao huyết áp và rối loạn hô hấp [7]; viêm khớp [8]; bảo vệ gan [9]; bệnh tiểu đường [10]; bệnh viêm da [1]. Ngoài ra, hoa đậu biếc còn có hoạt tính chống oxy hóa giúp loại bỏ các gốc tự do [11]; ổn định nhiệt [12]; ngăn ngừa, hỗ trợ điều trị ung thư [13] và được ứng dụng làm chất chỉ thị phát hiện hàn the [14].

Hiện nay, các hợp chất thực vật có hoạt tính sinh học giúp hỗ trợ phòng và điều trị một số bệnh liên quan đến stress oxy hóa đang được quan tâm. Quy trình trích ly các hoạt chất trong dược liệu thường chú trọng đến hai yếu tố là điều kiện và hiệu suất trích ly. Thông thường, các nhà nghiên cứu sử dụng phương pháp cổ điển là luân phiên từng biến nhằm thay đổi các thông số khảo sát trong quá trình tối ưu hoá. Tuy nhiên, phương pháp này không thể hiện rõ ràng

sự tương tác hay ảnh hưởng giữa các biến với nhau. Do đó, hiện nay các nhà khoa học thường sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) kết hợp với thiết kế phức hợp trung tâm (Central Composite Design - CCD) để tối ưu hoá các thông số trong quá trình trích ly [15,16]. Phương pháp này đã được dùng để tối ưu hóa cho quá trình trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học cao như polyphenol [17,18, 19], flavonoid [20, 21], anthocyanin [22, 23].

Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học được tối ưu hóa theo phương pháp RSM - phương án CCD với mục tiêu tìm ra giá trị tối ưu của các nhân tố tác động trực tiếp đến quá trình trích ly, từ đó thu được lượng lớn hợp chất sinh học có nguồn gốc thực vật, làm tiền đề tạo sản phẩm ứng dụng trong y học cũng như dược phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Hoa đậu biếc được thu vào buổi sáng từ 7 - 8 giờ trong khuôn viên trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long. Hoa được chọn là những hoa trưởng thành, đã nở hoàn toàn, không bị sâu bệnh. Sau đó, hoa được chuyển đến phòng thí nghiệm, rửa sạch bằng nước máy, để ráo nước trong

điều kiện phòng và tiến hành thí nghiệm.

2.2 Hóa chất

Ethanol (Việt Nam), methanol (Trung Quốc), Folin-Ciocalteu (Trung Quốc), acid gallic (Trung Quốc), Na_2CO_3 (Trung Quốc), AlCl_3 (Trung Quốc), HCl (Việt Nam), NaH_2PO_4 (Trung Quốc), KH_2PO_4 (Trung Quốc), Bromocresol green (Trung Quốc), quercetin (Ấn Độ), atropine (Trung Quốc), chloroform (Việt Nam).

Bảng 1: Nồng độ ethanol (%), tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w) và thời gian trích ly (giờ) dùng trong phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD)

Yếu tố	Phạm vi nghiên cứu	Mức đánh giá				
		- α	-1	0	+1	+ α
Nồng độ ethanol (%)	0 – 90%	15	30	45	60	75
Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w)	0,5 – 2,5	0,5	1	1,5	2	2,5
Thời gian trích ly (giờ)	24 - 120	24	48	72	96	120

Hàm đáp ứng được chọn là hàm lượng polyphenol tổng (μg GAE/ml), flavonoid tổng (μg QE/ml) và alkaloid tổng (μg AE/ml). Mô hình tối ưu hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3$$

Trong đó:

- b_1, b_2, b_3 là các hệ số bậc 1
- b_{11}, b_{22}, b_{33} là các hệ số bậc 2
- b_{12}, b_{23}, b_{13} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố
- x_1, x_2, x_3 là các biến độc lập

2.4 Xác định hàm lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp của Yadav *et al.*, (2011) ^[24] có hiệu chỉnh. Chuyển 0,3 ml dịch chiết và 3 ml dung dịch Folin-

2.3 Thiết kế ma trận RSM-CCD

Ba yếu tố có ảnh hưởng nhất đến hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng trích ly từ hoa đậu biếc là nồng độ ethanol (%), tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w) và thời gian trích ly (giờ) được chọn để tiến hành thí nghiệm theo RSM-CCD nhằm xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 5 mức trong CCD 15 thí nghiệm (Bảng 1).

Ciocalteu 10% cho vào ống nghiệm để phản ứng trong 5 phút. Tiếp đến, thêm 3 ml Na_2CO_3 2% và ủ tối trong 45 phút. Sau đó, hỗn hợp được đo ở bước sóng 765 nm trên máy quang phổ kế (Model: UV 2602). Thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại. Acid gallic được dùng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu diễn bằng microgam acid gallic tương đương (μg GAE)/ml dịch chiết.

2.5 Xác định hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp của Chang *et al.*, (2002) ^[25] có hiệu chỉnh. Chuyển 0,625 ml dịch chiết và 1,875 ml methanol cho vào ống nghiệm để phản ứng trong 5 phút. Kế đến, thêm 0,125 ml AlCl_3 10% để phản ứng trong 6 phút. Tiếp theo, cho thêm 0,125 ml KH_2PO_4 1M và 3,5 ml nước vào hỗn hợp để ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sau đó, hỗn hợp được đo ở bước sóng 415 nm. Thí

nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại. Quercetin được dùng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu diễn bằng microgam quercetin tương đương ($\mu\text{g QE}$)/ml dịch chiết.

2.6 Xác định hàm lượng alkaloid tổng

Hàm lượng alkaloid tổng số được xác định theo phương pháp của Shamsa *et al.*, (2008) [26] có hiệu chỉnh. Chuyển 1 ml HCl 2N cho vào 1 ml dịch chiết rồi lọc bỏ cặn. Cho phần dung dịch vào bình tách chiết, thêm 3,5 ml bromocresol và 5 ml đệm phosphate 2M. Lắc mạnh dung dịch với 8 ml chloroform, chờ cho tách lớp hoàn toàn thì thu phần dung dịch dưới. Sau đó, hỗn hợp được đo ở bước sóng 430 nm. Thí

nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại. Atropine được dùng để xây dựng đường chuẩn và kết quả được biểu diễn bằng microgam atropine tương đương ($\mu\text{g AE}$)/ml dịch chiết.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng polyphenol tổng

Thí nghiệm RSM-CCD được tiến hành để xác định giá trị tối ưu của các yếu tố và số liệu được xử lý bằng phần mềm Design-Expert 13.0.5.0[®]. Kết quả hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng được tiên đoán theo mô hình được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Kế hoạch thực nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt - phương án cấu trúc có tâm để tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng trích ly từ hoa đậu biếc

Thí nghiệm	Yếu tố			Hợp chất sinh học		
	Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	Thời gian trích ly (giờ)	Polyphenol tổng ($\mu\text{g GAE/ml}$)	Flavonoid tổng ($\mu\text{g QE/ml}$)	Alkaloid tổng ($\mu\text{g AE/ml}$)
1	45	1,5	72	276,188 $\pm$ 3,570	336,278 $\pm$ 1,475	40,153 $\pm$ 0,203
2	45	0,5	72	228,203 $\pm$ 2,100	294,093 $\pm$ 1,382	34,573 $\pm$ 0,170
3	45	2,5	72	198,488 $\pm$ 1,050	258,693 $\pm$ 1,929	30,928 $\pm$ 0,0889
4	30	1,0	48	216,653 $\pm$ 5,653	282,145 $\pm$ 3,080	33,875 $\pm$ 1,009
5	60	1,0	48	259,178 $\pm$ 2,415	331,410 $\pm$ 3,194	38,533 $\pm$ 1,132
6	60	1,0	96	270,308 $\pm$ 3,758	330,673 $\pm$ 9,560	39,815 $\pm$ 0,203
7	75	1,5	72	250,778 $\pm$ 0,905	325,510 $\pm$ 9,709	36,485 $\pm$ 0,260
8	60	2,0	48	252,458 $\pm$ 4,247	312,678 $\pm$ 7,476	37,408 $\pm$ 0,270
9	45	1,5	120	246,158 $\pm$ 5,950	276,393 $\pm$ 5,963	35,113 $\pm$ 0,390
10	30	1,0	96	222,323 $\pm$ 4,288	288,783 $\pm$ 1,407	34,033 $\pm$ 2,258
11	45	1,5	24	234,608 $\pm$ 9,639	300,435 $\pm$ 4,200	35,608 $\pm$ 0,327
12	15	1,5	72	185,888 $\pm$ 0,105	225,063 $\pm$ 0,967	26,158 $\pm$ 0,045
13	60	2,0	96	264,218 $\pm$ 0,840	324,035 $\pm$ 9,869	39,118 $\pm$ 2,160
14	30	2,0	48	210,458 $\pm$ 7,375	270,345 $\pm$ 1,554	32,485 $\pm$ 0,225

15	30	2,0	96	204,368 ± 0,315	260,168 ± 1,407	31,558 ± 2,093
----	----	-----	----	-----------------	-----------------	----------------

Sau khi phân tích phương sai ANOVA, phương trình đa thức bậc hai được dùng như một mô hình để tiên đoán hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng:

$$\text{Polyphenols} = 276,57 + 20,13x_1 - 6,02x_2 + 2,85x_3 - 14,51x_1^2 - 15,76x_2^2 - 9,00x_3^2$$

$$\text{Flavonoids} = 341,56 + 24,89x_1 - 8,54x_2 - 2,56x_3 - 15,91x_1^2 - 15,63x_2^2 - 12,63x_3^2$$

$$\text{Alkaloids} = 41,00 + 2,73x_1 - 0,8128x_2 + 0,0787x_3 - 2,31x_1^2 - 1,96x_2^2 - 1,30x_3^2$$

(Trong đó, x_1 : Nồng độ ethanol, x_2 : Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, x_3 : Thời gian trích ly).

Kết quả phân tích ANOVA của mô hình dự đoán hàm lượng hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ hoa đậu biếc được trình bày Bảng 3. Trong đó, giá trị p -value của

mô hình là 0,0021 (có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%). Hệ số hồi quy (R^2) của mô hình là 0,9728, nghĩa là có 97,28% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình; trong khi đó, giá trị R^2 dự đoán (0,7567) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9238) với độ lệch 0,1671 (nhỏ hơn 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 15,6443 (lớn hơn 4 nhiễu), điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ để sử dụng dự đoán hàm lượng polyphenol. Ngoài ra, hệ số biến thiên (%CV) của mô hình là 3,28; cho thấy mô hình đáng tin cậy. Theo Chen *et al.*, (2020) [22], giá trị %CV cho biết mức độ chính xác của thí nghiệm, các thí nghiệm có độ tin cậy thấp thường có giá trị %CV cao, và ngược lại. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy mô hình điều có các thí nghiệm được thực hiện là đáng tin cậy.

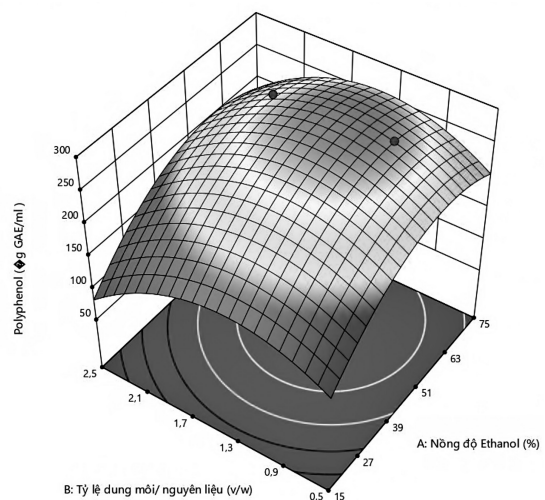
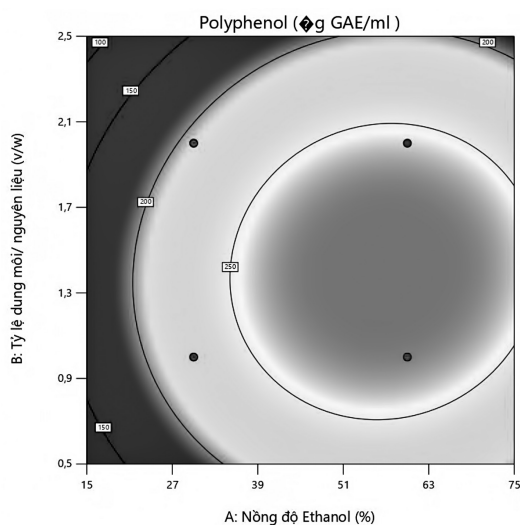
Bảng 3: Phân tích thống kê ANOVA các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ hoa đậu biếc

Yếu tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Ý nghĩa
Mô hình	10591,33	9	1176,81	19,86	0,0021	Ý nghĩa
X_1 -Nồng độ Ethanol (%)	6485,89	1	6485,89	109,48	0,0001	
X_2 -Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w)	580,69	1	580,69	9,80	0,0259	
X_3 -Thời gian (giờ)	129,79	1	129,79	2,19	0,1989	
X_{12}	16,07	1	16,07	0,2713	0,6247	
X_{13}	67,92	1	67,92	1,15	0,3332	
X_{23}	15,48	1	15,48	0,2614	0,6309	
X_1^2	2332,74	1	2332,74	39,38	0,0015	
X_2^2	2750,82	1	2750,82	46,43	0,0010	

Yếu tố	Tổng bình phương	đf	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Ý nghĩa
X_3^2	897,11	1	897,11	15,14	0,0115	
R^2	0,9728					
%CV	3,28					

Các yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng có sự tương tác với nhau từng cặp và được thể hiện trong biểu đồ đáp ứng bề mặt (Hình 1). Kết quả cho thấy nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu có ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly. Kết quả mô hình đáp ứng bề mặt cho thấy hàm lượng polyphenol tổng càng tăng khi nồng độ ethanol càng tăng, tuy nhiên không vượt quá 60%. Ngược lại, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu giảm đến mức 1,0. Trong đó, nồng độ ethanol là yếu tố ảnh hưởng

nhất đến hàm lượng polyphenol tổng. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Lý Hải Triều và ctv (2019)^[20] và Hồ Bá Vương và ctv (2015)^[27] đều xác định nồng độ ethanol là yếu tố chi phối mạnh đến hàm lượng polyphenol được trích ra từ lá nhàu và lá ổi bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM. Như vậy, kết quả thực nghiệm phù hợp với kết quả mô hình, các kết quả này đáng tin cậy và tìm ra được nồng độ ethanol phù hợp là yếu tố ảnh hưởng nhất đến quá trình trích ly polyphenol tổng từ hoa đậu biếc.



Hình 1: Bề mặt đáp ứng của hàm lượng polyphenol tổng theo nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu bằng phần mềm Design Expert

Từ kết quả phân tích bề mặt đáp ứng, quy trình trích ly polyphenol được xác định với những điều kiện sau: nồng độ ethanol là 60%, thời gian trích ly là 96 giờ và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 1:1 (v/w). Hàm

lượng polyphenol có giá trị tối ưu dự đoán là 270,308 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.2 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid tổng

Kết quả phân tích ANOVA của mô hình dự đoán hàm lượng hàm lượng flavonoid tổng trích ly từ hoa đậu biếc được trình bày Bảng 4. Trong đó, giá trị p -value của mô hình là 0,0023 (có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%). Hệ số hồi quy (R^2) của mô hình là 0,9718, nghĩa là có 97,18% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình; trong khi đó, giá trị

R^2 dự đoán (0,7375) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9211) với độ lệch 0,1836 (nhỏ hơn 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 15,133 (lớn hơn 4 rất nhiều), điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ để sử dụng dự đoán hàm lượng flavonoid. Ngoài ra, hệ số biến thiên (%CV) của mô hình là 3,12 cho thấy mô hình đáng tin cậy.

Bảng 4: Phân tích thống kê ANOVA các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng flavonoid tổng trích ly từ hoa đậu biếc

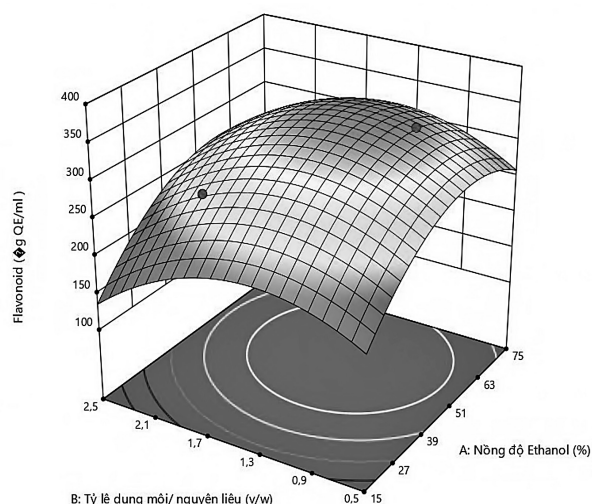
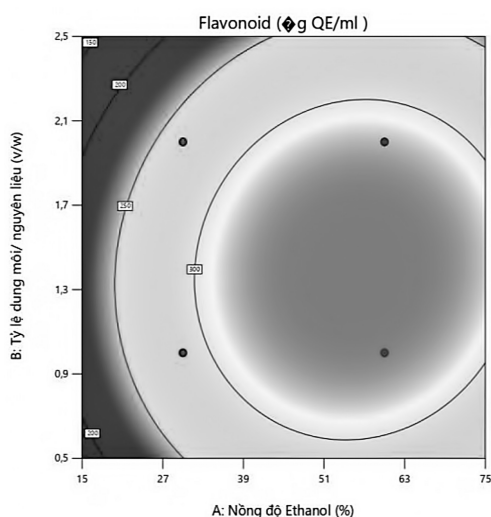
Yếu tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Ý nghĩa
Mô hình	14572,61	9	1619,18	19,17	0,0023	Ý nghĩa
X_1 -Nồng độ Ethanol (%)	9912,64	1	9912,64	117,36	0,0001	
X_2 -Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w)	1165,97	1	1165,97	13,80	0,0138	
X_3 -Thời gian (giờ)	105,08	1	105,08	1,24	0,3154	
X_{12}	28,29	1	28,29	0,3350	0,5878	
X_{13}	25,06	1	25,06	0,2967	0,6094	
X_{23}	2,79	1	2,79	0,0330	0,8630	
X_1^2	2803,00	1	2803,00	33,18	0,0022	
X_2^2	2706,37	1	2706,37	32,04	0,0024	
X_3^2	1765,74	1	1765,74	20,90	0,0060	
R^2	0,9718					
%CV	3,12					

Hàm lượng flavonoid tổng chịu ảnh hưởng bậc 1 và bậc 2 của cả 3 yếu tố nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu và thời gian trích ly. Các yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa hàm lượng flavonoid tổng có sự tương tác với nhau từng cặp và từ biểu đồ đáp ứng bề mặt có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố (Hình 2). Kết quả mô hình đáp ứng bề mặt cho thấy ảnh hưởng của sự tương tác giữa nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu đến hàm lượng

flavonoid tổng. Khi nồng độ ethanol tăng thì hàm lượng flavonoid tăng và đạt tối ưu nhất khi nồng độ ethanol ở mức 60%; ngược lại tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu giảm đến mức 1,0. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Xu *et al.*, (2016)^[28] và Jing *et al.*, (2015)^[21] xác định nồng độ ethanol là yếu tố chi phối mạnh đến hàm lượng flavonoid được trích ra từ hoa hồng mai và cây đinh lăng bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Như vậy, kết quả thực nghiệm phù hợp với

kết quả mô hình, từ đó tìm ra được nồng độ ethanol phù hợp là yếu tố ảnh hưởng nhất

đến quá trình trích ly flavonoid tổng từ hoa đậu biếc.



Hình 2: Bề mặt đáp ứng của hàm lượng flavonoid tổng theo nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu bằng phần mềm Design Expert

Từ kết quả phân tích mô hình bề mặt đáp ứng cho thấy hàm lượng flavonoid đạt giá trị tối ưu là 331,410 $\mu\text{g}/\text{ml}$ khi thực hiện trích ly ở nồng độ ethanol là 60%, thời gian trích ly là 48 giờ và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 1:1 (v/w).

3.3 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng alkaloid tổng

Kết quả phân tích ANOVA của mô hình dự đoán hàm lượng hàm lượng alkaloid tổng trích ly từ hoa đậu biếc được trình bày Bảng 5. Trong đó, giá trị p -value của

mô hình là 0,0014 (có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%). Hệ số hồi quy (R^2) của mô hình là 0,9771, nghĩa là có 97,71% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình; trong khi đó, giá trị R^2 dự đoán (0,7584) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9359) với độ lệch 0,1775 (nhỏ hơn 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 18,6792 (lớn hơn 4), điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ để sử dụng dự đoán hàm lượng alkaloid. Ngoài ra, hệ số biến thiên (%CV) của mô hình là 2,75 cho thấy mô hình đáng tin cậy.

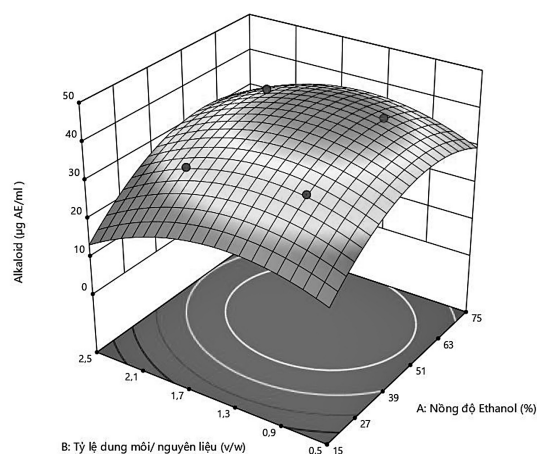
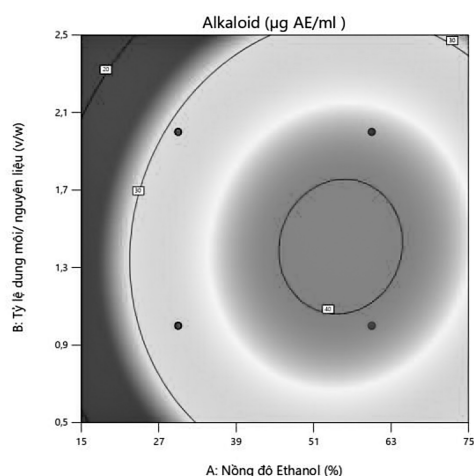
Bảng 5: Phân tích thống kê ANOVA các yếu tố ảnh hưởng hàm lượng alkaloid tổng trích ly từ hoa đậu biếc

Yếu tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Ý nghĩa
Mô hình	198,33	9	22,04	23,70	0,0014	Ý nghĩa
X ₁ -Nồng độ Ethanol (%)	118,83	1	118,83	127,82	<0,0001	
X ₂ -Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (v/w)	10,57	1	10,57	11,37	0,0199	

Yếu tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p	Ý nghĩa
X_3 -Thời gian (giờ)	0,0992	1	0,0992	0,1067	0,7571	
X_{12}	0,5356	1	0,5356	0,5761	0,4821	
X_{13}	1,74	1	1,74	1,87	0,2292	
X_{23}	0,0496	1	0,0496	0,0534	0,8265	
X_1^2	59,30	1	59,30	63,79	0,0005	
X_2^2	42,40	1	42,40	45,61	0,0011	
X_3^2	18,84	1	18,84	20,26	0,0064	
R^2	0,9771					
%CV	2,75					

Các yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa hàm lượng alkaloid tổng có sự tương tác với nhau được thể hiện trong biểu đồ đáp ứng bề mặt (Hình 3). Kết quả cho thấy dung môi là một trong các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình trích ly. Khi nồng độ ethanol tăng từ 15% lên 75%, hàm lượng alkaloid tổng đạt tối ưu ở 60%. Bên cạnh đó, tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu dẫn đến tăng hiệu suất trích ly. Điều này phù hợp với nghiên cứu của

Xiong *et al.*, (2016)^[29] và Ruan *et al.*, (2017)^[30] xác định nồng độ ethanol là yếu tố chi phối mạnh đến hàm lượng alkaloid được trích ra từ hoa sen và hoa bói mấu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM. Như vậy, kết quả thực nghiệm phù hợp với kết quả mô hình, các kết quả này đáng tin cậy và tìm ra được nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu phù hợp ảnh hưởng đến quá trình trích ly alkaloid tổng từ hoa đậu biếc.



Hình 3: Bề mặt đáp ứng của hàm lượng flavonoid tổng theo nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu bằng phần mềm Design Expert

Từ kết quả phân tích bề mặt đáp ứng, điều kiện tối ưu để trích ly alkaloid tổng

được xác định với những điều kiện sau: nồng độ ethanol là 60%, thời gian trích ly là 48 giờ và tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 2:1 (v/w), hàm lượng alkaloid đạt được là 39,118 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 5. Kiểm định mô hình thực tế trích ly polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng của hoa đậu biếc

	Lặp lại 1	Lặp lại 2	Lặp lại 3	Trung bình
Polyphenol tổng ($\mu\text{g GAE/ml}$)	270,122	276,389	269,037	$271,849 \pm 3,969$
Flavonoid tổng ($\mu\text{g QE/ml}$)	330,319	333,608	329,244	$331,057 \pm 2,274$
Alkaloid tổng ($\mu\text{g AE/ml}$)	40,331	39,624	41,948	$40,634 \pm 1,191$

Trong đó, hàm lượng polyphenol tổng và alkaloid tổng đạt giá trị cao hơn so với mô hình dự đoán, các giá trị lần lượt là 271,849 $\mu\text{g GAE/ml}$ (so với mô hình là 270,308 $\mu\text{g GAE/ml}$) và 40,634 $\mu\text{g AE/ml}$ (so với mô hình là 39,118 $\mu\text{g AE/ml}$). Trong khi đó, hàm lượng flavonoid tổng tương đương với mô hình dự đoán là 331,057 $\mu\text{g QE/ml}$ (so với mô hình là 331,410 $\mu\text{g QE/ml}$). Như vậy, nghiên cứu đã xác định các giá trị tối ưu cho từng hợp chất trích ly trong hoa đậu biếc đã được đánh giá mức độ mô hình và kiểm định thực tế nên kết quả này có độ tin cậy cao.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của 3 nhân tố (nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu và thời gian trích ly) đến hàm lượng các hợp chất sinh học. Các giá trị tối ưu để trích ly polyphenol tổng và flavonoid tổng như sau: nồng độ ethanol là 60%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 1:1 (v/w) và thời

3.4 Kiểm định mô hình thực tế

Kết quả kiểm định mô hình thực tế được trình bày trong bảng 5. Các thí nghiệm kiểm định được thực hiện với ba lần lặp lại.

gian trích ly lần lượt là 96 giờ và 48 giờ. Đối với trích ly alkaloid tổng như sau: nồng độ ethanol là 60%, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 2:1 (v/w) và thời gian trích ly là 96 giờ. Tại điều kiện chiết tối ưu, hàm lượng polyphenol, flavonoid và alkaloid thu được lần lượt là 270,308 $\mu\text{g GAE/ml}$ dịch chiết, 331,410 $\mu\text{g QE/ml}$ dịch chiết và 39,118 $\mu\text{g AE/ml}$ dịch chiết. Các giá trị kiểm định thực tế từ mô hình tối ưu hóa polyphenol tổng, flavonoid tổng và alkaloid tổng lần lượt là 271,849 $\mu\text{g GAE/ml}$, 331,057 $\mu\text{g QE/ml}$ và 40,634 $\mu\text{g AE/ml}$.

Công cụ thiết kế thí nghiệm tối ưu nhiều nhân tố theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - cấu trúc có tâm (CCD) là một công cụ hữu ích cho việc tối ưu hóa giá trị của các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình trích ly hợp chất sinh học. Đồng thời, kết hợp với phần mềm chuyên dụng Design - Expert giúp giảm đáng kể số lượng các thí nghiệm và thời gian thực hiện thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nair, V., Bang, W. Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., & Cisneros-Zevallos, L. (2015). *Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (Clitoria ternatea Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide*

- (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. Journal of agricultural and food chemistry, 63(28), 6355-6365. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00928>.
- [2]. Campbell, S. M., Pearson, B., & Marble, S. C. (2019). *Butterfly Pea (Clitoria ternatea) Flower Extract (BPFE) and Its Use as a pH-Dependent Natural Colorant*: (ENH-1309/EP573, 4/2019). EDIS, 2019(2).
- [3]. Terahara, N., Oda, M., Matsui, T., Osajima, Y., Saito, N., Toki, K., & Honda, T. (1996). *Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from Clitoria ternatea flowers*. Journal of natural products, 59(2), 139-144. <https://doi.org/10.1021/np960050a>
- [4]. Chong, F. C., & Gwee, X. F. (2015). *Ultrasonic extraction of anthocyanin from Clitoria ternatea flowers using response surface methodology*. Natural product research, 29(15), 1485-1487. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1027892>
- [5]. Manivannan, R. (2019). *Isolation and Characterizations of new alkaloid 3-deoxy-3, 11-epoxy cephalotaxine from Clitoria ternatea*. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 9(4-A), 458-462. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-A.3472>
- [6]. Bishoyi, A. K., and Geetha, K. A. (2012). *Polymorphism in flower colour and petal type in Aparajita (Clitoria ternatea)*. Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 3(2), 12.
- [7]. Kavitha, R., & Premalakshmi, V. (2013). *Phytochemical analysis of ethanolic extract of leaves of Clitoria ternatea L.*
- [8]. Adhikary, R., Sultana, S., & Bishay, B. (2018). *Clitoria ternatea flower petals: Effect on TNFR1 neutralization via downregulation of synovial matrix metalloproteases*. Journal of ethnopharmacology, 210, 209-222. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.017>
- [9]. Nithianantham, K., Ping, K. Y., Latha, L. Y., Jothy, S. L., Darah, I., Chen, Y., ... & Sasidharan, S. (2013). *Evaluation of hepatoprotective effect of methanolic extract of Clitoria ternatea (Linn.) flower against acetaminophen-induced liver damage*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(4), 314-319. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60075-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60075-4)
- [10]. Hungerford, G., Divers, R., Lemos, M. A., & Chu, B. S. (2018). *Interaction of Clitoria ternatea L. flower extract with alpha-amylase by photon streaming time-resolved fluorescence*. Biophysical Journal, 114(3), 418a.
- [11]. Phrueksanan, W., Yibchok-anun, S., & Adisakwattana, S. (2014). *Protection of Clitoria ternatea flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes*. Research in veterinary science, 97(2), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.08.010>
- [12]. Motohashi, S., & Nakayama, T. (2008). *Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer*. Cancer science, 99(4), 638-645. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00730.x>
- [13]. Neda, G. D., Rabeta, M. S., & Ong, M. T. (2013). *Chemical composition and anti-*

proliferative properties of flowers of Clitoria Ternatea. International Food Research Journal, 20(3).

- [14]. Nguyễn Xuân Thị Diễm Trinh (2021). *Nghiên cứu quy trình chiết anthocyanin từ hoa đậu biếc khô ứng dụng làm chất chỉ thị phát hiện hàn the*. Tạp chí Công thương.
- [15]. Zhang, X., Gu, C., Ahmad, B., & Huang, L. (2017). *Optimization of extract method for Cynomorium songaricum Rupr. by response surface methodology*. Journal of analytical methods in chemistry, 2017, Article ID 6153802, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/6153802>
- [16]. Long, H., Cai, X., Yang, H., He, J., Wu, J., & Lin, R. (2017). *Optimization of monomethoxy polyethyleneglycol-modified oxalate decarboxylase by response surface methodology*. Journal of biological physics, 43(3), 445-459.
- [17]. Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Diễm Sương (2018). *Tối ưu hóa các thông số quá trình xử lý enzyme để tăng sản lượng dịch trích và các hợp chất có hoạt tính sinh học từ trái thanh trà (Bouea macrophylla Griffith) bằng phương pháp bề mặt đáp ứng*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Tập 54, Số chuyên đề: Nông nghiệp (2018): 117-125
- [18]. Pinto, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., ... & Rodrigues, F. (2021). *Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology*. Food Chemistry, 334, 127521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127521>
- [19]. Benarfa, A., Gourine, N., Hachani, S., Harrat, M., & Yousfi, M. (2020). *Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidative phenolic compounds from Deverra scoparia Coss. & Durieu (flowers) using response surface methodology*. Journal of Food Processing and Preservation, 44(7), e14514. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14514>
- [20]. Lý Hải Triều, Nguyễn Thùy Diễm Thảo, Phùng Thị Thu Hương, Trần Bá Hiếu, Lê Văn Minh (2019). *Khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu (Morinda citrifolia L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 61(9), 21-28.
- [21]. Jing, C. L., Dong, X. F., & Tong, J. M. (2015). *Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method*. Molecules, 20(9), 15550-15571. <https://doi.org/10.3390/molecules200915550>
- [22]. Chen, X. Q., Li, Z. H., Wang, Z. J., Liu, L. L., Sun, T. T., Ma, J. Z., & Zhang, Y. (2020). *Ultrasound-assisted extraction of total anthocyanins from Rubia sylvatica Nakai fruit and radical scavenging activity of the extract*. Industrial Crops and Products, 150, 112420. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112420>
- [23]. Phạm Thị Mai Quế, Nguyễn Minh Thủy. (2016). *“Biện pháp tiền xử lý và tối ưu hoá quá trình trích ly anthocyanin từ vỏ khoai lang tím”*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (2016) (1): 43-50.

- [24]. Yadav and Agarwala Munin. 2011. *Phytochemical analysis of some medicinal plants*. Journal of Phytochemistry, 3(12):10-14.
- [25]. Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen and J. C. Chern. 2002. *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*. Journal of food and drug analysis, 10(3): 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- [26]. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., & Verdian-rizi, M. (2008). *Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants*. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 32, 17-20.
- [27]. Hồ Bá Vương, Nguyễn Xuân Duy và Nguyễn Anh Tuấn. (2015), “*Tối ưu hóa chiết polyphenol từ lá ổi bằng phương pháp bề mặt đáp ứng*”. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2015, tập 13, số 7: 1144-1152
- [28]. Xu, D. P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A. N., & Li, H. B. (2016). *Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of Jatropha integerrima by response surface methodology*. Molecules, 21(1), 18. <https://doi.org/10.3390/molecules21010018>
- [29]. Xiong, W., Chen, X., Lv, G., Hu, D., Zhao, J., & Li, S. (2016). *Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology*. Journal of pharmaceutical analysis, 6(6), 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.007>
- [30]. Ruan, X., Cui, W. X., Yang, L., Li, Z. H., Liu, B., & Wang, Q. (2017). *Extraction of total alkaloids, peimine and peiminine from the flower of Fritillaria thunbergii Miq using supercritical carbon dioxide*. Journal of CO2 Utilization, 18, 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.01.024>

Thông tin phản biện: TS. Trần Thanh Mến; ThS. Nguyễn Thị Phương Tâm