

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT TRONG ĐIỀU CHẾ CAO LÁ GIANG (*Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire) BẰNG MÔ HÌNH BOX-BEHNKEN

Phù Thị Thanh Khiết^{1,*}, Trương Thị Tú Trân¹, Trần Việt Quyền¹,
Kong Narin¹, Lê Thái Anh Thư²

¹ Khoa Khoa học Thực phẩm và Sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang

² Khoa Kỹ thuật và Công nghệ, Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp

*Email: pttkhiết@vnkgu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol tổng (TPC) và flavonoid tổng (TFC) trong điều chế cao lá giang (*Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire). Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) dựa trên thiết kế Box-Behnken (BBD), ba biến khảo sát bao gồm: Nồng độ ethanol (50 - 90%); tỷ lệ dung môi: mẫu (10: 1 - 20: 1, mL/g) và thời gian siêu âm (5 - 15 phút), chỉ tiêu theo dõi hàm lượng TPC (mg GAE/g CK) và TFC (mg QE/g CK). Kết quả cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê cao ($P_{model} < 0,0001$), giá trị *Lack-of-fit* > 0,05 ($P_{TPC} = 0,069$; $P_{TFC} = 0,219$), hệ số xác định $R^2 > 98\%$ ở cả hai mô hình, qua đó chứng tỏ mô hình phù hợp và ổn định. Các yếu tố tuyến tính bậc hai và tương tác đều ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết, thể hiện tính phi tuyến và sự tồn tại điểm cực đại trong vùng khảo sát. Điều kiện chiết xuất tối ưu được xác định là ethanol 73%, tỷ lệ dung môi: mẫu 16: 1 (mL/g) và thời gian siêu âm 10,5 phút. Kiểm chứng thực nghiệm bằng kiểm định hai phía ($\mu \neq \mu_0$) cho thấy tính chính xác của mô hình dự đoán. Kết quả trên là thông tin khoa học tin cậy nhằm phát triển quy trình sản xuất cao giàu hợp chất sinh học.

Từ khoá: Cao lá giang, Box-Behnken, flavonoids, polyphenols, sóng siêu âm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lá giang (*Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire) là cây dược liệu thuộc họ Apocynaceae [1], loài dây leo phân bố rộng ở khu vực Đông Nam Á như: Thái Lan, Campuchia, Lào và Việt Nam [2]. Trong y học dân gian ở Việt Nam, lá giang được sử dụng truyền thống như một loại rau hoặc thuốc. Các nghiên cứu hóa học đã công bố cho thấy, lá giang chứa nhiều nhóm hợp chất sinh học quan trọng như: Triterpenoid (đặc biệt axit ursolic), alkaloid, steroid, glycosid tim, saponin, coumarin và các hợp chất phenolic [3, 4]. Trong đó, hợp chất phenolic và flavonoid là hai nhóm nổi bật, thường được định lượng dưới dạng TPC và TFC, đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính chống oxy hóa và thể hiện hoạt tính kháng [5]. Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu và khai thác các hợp chất sinh học từ thực vật đã trở thành xu hướng nổi bật trong lĩnh vực dược liệu và thực phẩm chức năng. TPC và TFC là những nhóm hợp chất quan trọng, có hoạt

tính chống oxy hóa mạnh, góp phần nâng cao giá trị sinh học của các sản phẩm chiết xuất từ thực vật. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, hiệu quả chiết xuất TPC và TFC phụ thuộc đáng kể vào các yếu tố công nghệ như nồng độ dung môi ethanol [6,7], tỷ lệ dung môi: Mẫu [8] và thời gian siêu âm [9].

Phương pháp bề mặt đáp ứng kết hợp với mô hình thiết kế thí nghiệm Box-Behnken đã được ứng dụng rộng rãi nhằm tối ưu hóa quá trình chiết xuất hợp chất sinh học [10, 11]. Mô hình đánh giá đồng thời sự tương tác phi tuyến giữa các yếu tố, xác định vùng điều kiện tối ưu, đồng thời giảm số lượng thí nghiệm cần thiết so với các phương pháp truyền thống [12]. Hiện nay, các nghiên cứu về lá giang chỉ dừng lại ở việc mô tả thành phần hóa học và hoạt tính sinh học [3, 4] mà chưa có công bố về tối ưu hóa quá trình chiết xuất TPC và TFC trong điều chế cao. Xu hướng nghiên cứu hiện nay cho thấy, việc kết hợp siêu âm hỗ trợ với mô hình Box-Behnken là phương pháp hiệu quả

để nâng cao hiệu suất chiết xuất và phân tích sự tương tác giữa các yếu tố công nghệ [6, 8]. Do đó, nghiên cứu này là cần thiết nhằm chuẩn hóa quy trình sản xuất cao từ lá giang, góp phần phát triển nguồn nguyên liệu dược liệu và thực phẩm chức năng có giá trị.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hoá chất và thiết bị

Nguyên liệu: Lá giang được thu hái vào tháng 4 năm 2025 tại xã Gò Quao, tỉnh An Giang. Sau khi thu hái, mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm Trường Đại học Kiên Giang, rửa sạch để ráo nước. Lá được sấy bằng phương pháp nhiệt đối lưu ở 55°C cho đến khi đạt độ ẩm $9 \pm 1\%$. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn và bảo quản ở -18°C, sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm.

Các hoá chất sử dụng gồm: Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N, Đức); Na_2CO_3 (99,8%, Xilong, Trung Quốc); $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98%, Xilong, Trung Quốc); NaNO_2 (99%, Xilong, Trung Quốc); NaOH (96%, Xilong, Trung Quốc); ethanol (99,5%, Xilong, Trung Quốc); methanol (99,5%, Xilong, Trung Quốc).

Thiết bị, dụng cụ: Tủ sấy nhiệt đối lưu (dung tích 108 lít, UF110Memmert, Đức); bể rửa siêu âm (18 lít, Elma S180H, Đức); máy ly tâm (Rotofix 32A, Hettich, Đức); máy quang phổ UV-

vis (UV 1800, Shimadzu, Nhật Bản); cân sấy ẩm (MS70, A&D, Nhật Bản); máy cô quay chân không (EV400, LabTech, Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Cân 20 g bột lá giang cho vào bình tam giác 500 ml cổ nhám có nút đậy. Cho ethanol vào bình tam giác lắc nhẹ cho mẫu ngập trong dung môi, đặt bình tam giác vào bể rửa siêu âm tiến hành đánh sóng siêu âm tần số 37 kHz cố định nhiệt độ 55°C. Sau đó, mẫu được ly tâm 6.000 vòng trong 15 phút, dịch chiết thu được dùng thiết bị cô quay chân không quay ở áp suất 150 ± 1 mbar, nhiệt độ 55°C, tốc độ quay 200 rpm. Cao thu được tiến hành phân tích các chỉ tiêu theo dõi.

Yếu tố khảo sát: Nồng độ ethanol trích ly 50 - 90%; tỷ lệ dung môi : mẫu 10: 1 - 20: 1 mL/g; thời gian siêu âm 5 - 15 phút. Chỉ tiêu theo dõi gồm: Hàm lượng TPC (mg GAE/g CK) và TFC (mg QE/g CK).

2.2.2. Thiết kế mô hình hóa thí nghiệm

Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng thiết kế theo mô hình Box-Behnken với 3 yếu tố độc lập bao gồm: Nồng độ môi ethanol trích ly (X_1); tỷ lệ dung môi: mẫu (X_2), thời gian siêu âm (X_3), thí nghiệm thực hiện ở 3 mức độ khảo sát -1 (thấp); 0 (cơ sở); +1 (cao), phạm vi và mức độ các biến được bố trí như trong bảng 1.

Bảng 1. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken với 3 yếu tố

Yếu tố	Đơn vị	Biến mã hóa	Mức mã hóa		
			-1	0	+1
Nồng độ ethanol	%	X_1	50	70	90
Dung môi : mẫu	mL/g	X_2	10:1	15:1	20:1
Thời gian siêu âm	Phút	X_3	5	10	15

Phần mềm thống kê Statgraphic được sử dụng phân tích và lựa chọn mô hình phù hợp cho các dữ liệu thu được. Mức độ tương thích của mô hình được kiểm định và đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA. Phương trình hồi quy bậc hai được xây dựng bằng phần mềm Statgraphic. Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 + \beta_{33} X_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Trong đó: Y là biến phụ thuộc; β_0 là hệ số hồi quy tại tâm; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ là hệ số tuyến tính; $\beta_{11}, \beta_{22},$

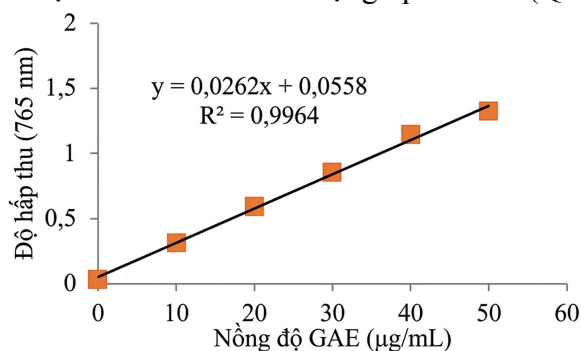
β_3 là hệ số bình phương; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ là hệ số tương tác; X_1, X_2, X_3 là biến độc lập.

2.2.3. Phương pháp phân tích TPC và TFC

Polyphenol tổng được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [3]. Giá trị mật độ quang được đo tại bước sóng 765 nm bằng quang phổ UV-vis. Hàm lượng polyphenol có trong mẫu được tính theo hàm lượng gallic axit (GAE) theo phương trình đường chuẩn hình 1.

Flavonoid tổng được xác định bằng phương pháp phản ứng tạo màu với AlCl_3 [4]. Giá trị mật độ quang được đo tại bước sóng 510 nm bằng

quang phổ UV-vis. Hàm lượng flavonoid có trong mẫu được tính theo hàm lượng quercetin (QE)

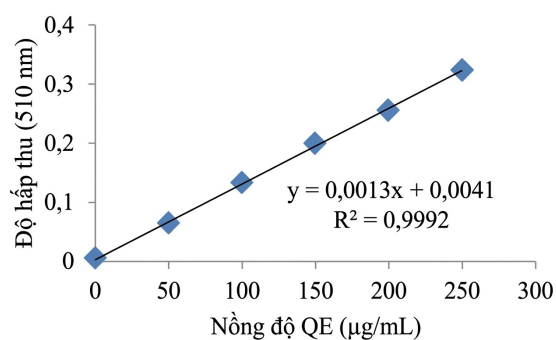


Hình 1. Đồ thị đường chuẩn gallic axit

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Mô hình BBD thuộc nhóm RSM được lựa chọn nhằm khảo sát ảnh hưởng đồng thời của nhiều yếu tố (X) đến các biến đáp ứng (Y). Mô hình đánh giá tác động riêng lẻ của từng yếu tố đến các biến đáp ứng, xác định tương tác hai chiều và ba chiều giữa các yếu tố và xây dựng phương trình hồi quy bậc hai để mô phỏng bề mặt đáp ứng, từ đó tối ưu hóa đáp ứng cho quá

theo phương trình đường chuẩn hình 2.



Hình 2. Đồ thị đường chuẩn quercetin

trình trích ly TPC và TFC trong điều chế cao lá giang.

3.1. Phương trình hồi quy

Mô hình BBD được xây dựng với ba yếu tố liên tục: Nồng độ ethanol (50 - 90%); tỷ lệ dung môi : mẫu (10: 1 - 20: 1 mL/g) và thời gian siêu âm (5 - 15 phút). Thiết kế gồm 17 nghiệm thức, trong đó có 5 lần lặp lại tại điểm trung tâm. Bảng 2 trình bày kết quả hàm lượng TPC và TFC trong cao lá giang.

Bảng 2. Hàm lượng TPC, TFC theo mô hình BBD

STT	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
	Nồng độ ethanol (%)	Dung môi : Mẫu (mL/g)	Thời gian siêu âm (phút)	TPC (mg GAE/g CK)	TFC (mg QE/g CK)
1	70	10: 1	5	23,776	18,280
2	70	15: 1	10	51,990	21,484
3	90	15: 1	5	26,334	18,639
4	70	15: 1	10	53,264	21,721
5	90	15: 1	15	44,639	17,036
6	50	20: 1	10	28,679	16,946
7	50	15: 1	15	26,164	18,390
8	70	10: 1	15	41,807	18,080
9	70	15: 1	10	56,096	21,166
10	70	20: 1	15	32,690	20,209
11	90	10: 1	10	30,883	17,284
12	70	15: 1	10	55,570	21,577
13	70	20: 1	5	37,853	18,725
14	70	15: 1	10	54,771	21,204
15	90	20: 1	10	42,940	20,000
16	50	10: 1	10	27,103	17,511
17	50	15: 1	5	24,969	16,088

Kết quả phân tích thống kê ANOVA (Bảng 3) cho thấy, mô hình thí nghiệm được xây dựng có ý nghĩa thống kê rất cao với giá trị *P-Value* của mô hình (Model) < 0,0001. Điều này khẳng

định rằng, mô hình phù hợp để dự đoán và tối ưu hóa quá trình trích ly TPC và TFC từ lá giang.

Đối với hàm lượng TPC, các yếu tố bậc một (X₁: Nồng độ ethanol, X₂: Tỷ lệ dung môi :

mẫu, X_3 : Thời gian siêu âm) có $P\text{-Value} < 0,05$, cho thấy cả ba yếu tố tuyến tính đóng góp đáng kể vào mô hình. Trong đó, nồng độ ethanol (X_1) có ảnh hưởng mạnh nhất, là yếu tố quyết định khả năng hòa tan polyphenol. Thời gian siêu âm (X_3) giữ vai trò quan trọng trong việc phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng polyphenol, trong khi tỷ lệ dung môi : mẫu (X_2) ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán và hòa tan hợp chất phenolic. Các yếu tố bậc hai (X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3) có $P\text{-Value}$ rất nhỏ, chứng minh mối quan hệ phi tuyến tính giữa các biến và TPC, nghĩa là hiệu quả trích ly đạt cực đại ở một khoảng tối ưu thay vì tăng tuyến tính. Các yếu tố tương tác (X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3) có $P\text{-Value} < 0,05$, cho thấy quá trình trích ly TPC trong lá giang có sự tác động của đa yếu tố và phụ thuộc vào sự phối hợp giữa các yếu tố tương tác. Đối với hàm lượng TFC, các yếu tố bậc một (X_1 , X_2 , X_3) có $P\text{-Value} < 0,05$, chứng minh các yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến khả năng trích ly flavonoid. Trong đó, nồng độ ethanol (X_1 , $P\text{-Value} = 0,004$) và tỷ lệ dung môi: Mẫu (X_2 , $P\text{-Value} = 0,002$) có ảnh hưởng mạnh nhất, quyết định khả năng hòa tan và khuếch tán hợp chất flavonoid. Thời gian siêu âm (X_3 , $P\text{-Value} = 0,043$) ảnh hưởng nhưng mức độ thấp hơn, cho thấy hiệu quả siêu âm phụ thuộc vào sự phối hợp với dung môi. Các yếu tố bậc hai (X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3) có $P\text{-Value}$ rất nhỏ, qua đó khẳng định mối quan hệ phi tuyến tính của các yếu tố này. Các tương tác (X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3) đều có $P\text{-Value} < 0,05$, chứng minh sự kết hợp giữa

các yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chiết xuất TFC.

Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 3) thể hiện độ tin cậy và chính xác của mô hình thông qua các giá trị *Lack-of-fit* (TPC, $P\text{-Value} = 0,069 > 0,05$; TFC, $P\text{-Value} = 0,219 > 0,05$), chứng minh mô hình không có sai lệch đáng kể qua đó phản ánh tốt mối quan hệ giữa các biến độc lập (nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi: Mẫu, thời gian siêu âm) và biến phụ thuộc (TPC và TFC); giá trị $R^2 > 95\%$ (TPC, $R^2 = 99,293\%$; TFC, $R^2 = 98,875\%$), cho thấy mô hình giải thích gần như toàn bộ biến thiên của dữ liệu, trong khi *Adjusted R²* (TPC, *Adjusted R²* = 98,385%; TFC, *Adjusted R²* = 97,430%) có sự chênh lệch nhỏ ($\leq 2\%$) so với R^2 , khẳng định mô hình ổn định.

Bên cạnh các chỉ số truyền thống như R^2 , R^2 điều chỉnh và *Lack-of-fit*, việc đánh giá thêm *Adequate Precision (AP)* và *Coefficient of Variation (CV)* chứng minh thêm về độ tin cậy của mô hình. Kết quả cho thấy, *AP* của TPC và TFC lần lượt đạt 58,1 và 90,1, đều vượt xa ngưỡng chấp nhận 4, chứng minh khả năng phân biệt nhiều rất cao. Đồng thời, *CV* của TPC (1,69%) và TFC (1,11%) đều thấp hơn nhiều so với ngưỡng 10%, phản ánh dữ liệu ổn định và mô hình có độ chính xác cao. Như vậy, sự kết hợp giữa các chỉ số truyền thống và các chỉ số hỗ trợ này khẳng định rằng, mô hình Box-Behnken không chỉ phù hợp về mặt toán học mà còn có khả năng dự đoán ổn định, nâng cao giá trị ứng dụng thực tiễn và học thuật của nghiên cứu.

Bảng 3. Kết quả phân tích thống kê và phương sai (ANOVA)

Nguồn biến thiên	TPC					TFC				
	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Tỷ số F	Giá trị P	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Tỷ số F	Giá trị P
Mô hình	2466,800	9	274,089	505,691	< 0,0001	51,213	9	5,690	173,201	< 0,0001
X_1 : Nồng độ ethanol	179,371	1	179,371	189,110	< 0,0001	2,024	1	2,024	35,200	0,004
X_2 : Dung môi : mẫu	43,213	1	43,213	45,560	0,003	2,791	1	2,791	48,540	0,002
X_3 : Thời gian siêu âm	130,961	1	130,961	138,070	< 0,0001	0,492	1	0,492	8,550	0,043
X_1X_1	804,292	1	804,292	847,950	< 0,0001	24,055	1	24,055	418,390	< 0,0001

X_1X_2	27,463	1	27,463	28,950	0,006	2,691	1	2,691	46,810	0,002
X_1X_3	73,188	1	73,188	77,160	0,001	3,812	1	3,812	66,310	0,001
X_2X_2	448,081	1	448,081	472,400	< 0,0001	5,141	1	5,141	89,410	0,001
X_2X_3	134,490	1	134,490	141,790	< 0,0001	0,709	1	0,709	12,330	0,025
X_3X_3	625,742	1	625,742	659,710	< 0,0001	9,498	1	9,498	165,200	< 0,0001
Sai số do mô hình không phù hợp	15,305	3	5,102	5,380	0,069	0,397	3	0,132	2,300	0,219
Sai số thuần	3,794	4	0,949			0,230	4	0,057		
Tổng (hiệu chỉnh)	2702,510	16	168,907			55,781	16	3,486		
Phần dư	19,099	7	0,542			0,627	7	0,033		
Hệ số xác định R^2	99,293%					98,875%				
Hệ số xác định R^2 (điều chỉnh theo bậc tự do)	98,385%					97,430%				
Sai số chuẩn của ước lượng	0,974					0,240				

Phương trình hồi quy đa biến (1) và (2) được xây dựng nhằm tối ưu hóa biến thiên của hàm lượng TPC và TFC ảnh hưởng bởi các điều kiện chiết (X_1 , X_2 , X_3), từ đó dự đoán được hàm lượng TPC, TFC khi thay đổi các điều kiện chiết trong phạm vi mô hình khảo sát mà không cần chạy thí nghiệm mới.

$$Y_1 = -263,349 + 4,25331 \cdot X_1 + 13,3292 \cdot X_2 + 11,0466 \cdot X_3 - 0,0345524 \cdot X_1^2 + 0,0262025 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,042775 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,412639 \cdot X_2^2 - 0,23194 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,487629 \cdot X_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = -23,5252 + 0,836307 \cdot X_1 + 0,70149 \cdot X_2 + 1,68191 \cdot X_3 - 0,0059755 \cdot X_1^2 + 0,0082025 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,0097625 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,044198 \cdot X_2^2 + 0,01684 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,060078 \cdot X_3^2 \quad (2)$$

Trong đó: Y_1 là hàm lượng TPC (mg GAE/g CK); Y_2 là hàm lượng TFC (mg QE/g CK); X_1 là nồng độ ethanol (%); X_2 là dung môi : mẫu (mL/g); X_3 là thời gian siêu âm (phút).

Phân tích hệ số hồi quy phương trình (1) cho thấy, mô hình bậc hai mô tả hợp lý ảnh hưởng của ba yếu tố lên hàm lượng TPC. Các hệ số tuyến tính dương ($\beta_1 = 4,25331$; $\beta_2 = 13,3292$; β_3

$= 11,0466$) cho thấy tăng X_1 , X_2 , X_3 làm tăng TPC ở vùng cục bộ, trong đó X_2 và X_3 có ảnh hưởng mạnh hơn X_1 . Các hệ số bậc hai âm ($\beta_{11} = -0,03455$; $\beta_{22} = -0,412639$; $\beta_{33} = -0,487629$) chỉ ra tính phi tuyến và sự bão hòa hiệu quả chiết. Tương tác dương nhẹ giữa X_1 và X_2 ($\beta_{12} = 0,02620$) và giữa X_1 và X_3 ($\beta_{13} = 0,042775$) cho thấy sự cộng hưởng khi tăng đồng thời nồng độ ethanol với tỷ lệ dung môi hoặc thời gian siêu âm, trong khi tương tác âm giữa X_2 và X_3 ($\beta_{23} = -0,23194$) thể hiện tăng đồng X_2 và X_3 có thể giảm lượng TPC trong cao chiết. Kết quả cho thấy, muốn tối ưu hóa điều kiện chiết cần cân bằng giữa các yếu tố khảo sát, ưu tiên khảo sát các yếu tố X_2 và X_3 để xác định được điều kiện chiết xuất hàm lượng TPC cực đại.

Tương tự như vậy, phương trình (2), các hệ số tuyến tính dương ($\beta_1 = 0,836307$; $\beta_2 = 0,70149$; $\beta_3 = 1,68191$) cho thấy tăng cục bộ từng yếu tố đều làm tăng hàm lượng TFC, trong đó X_3 có ảnh hưởng tuyến tính mạnh nhất. Các hệ số bậc hai âm ($\beta_{11} = -0,0059755$; $\beta_{22} = -0,044198$; $\beta_{33} = -0,060078$) biểu thị tính phi tuyến và sự bão hòa của quá trình chiết, hệ số bậc hai lớn hơn theo trị

tuyệt đối ở giá trị X_2 và X_3 cho thấy hai yếu tố này dễ đạt bão hòa hơn X_1 . Tương tác giữa các biến làm nổi bật tính phối hợp giữa các yếu tố X_1 và X_2 ; X_2 và X_3 có hiệu ứng cộng hưởng nhẹ ($\beta_{12}=0,0082025$; $\beta_{23}=0,01684$), trong khi cặp X_1 và X_3 biểu hiện tương tác giảm ($\beta_{13}=-0,0097625$) hàm lượng TFC, nghĩa là tối ưu hóa phải cân bằng đồng thời nhiều yếu tố tác động mà không thể dựa trên các tác động riêng lẻ

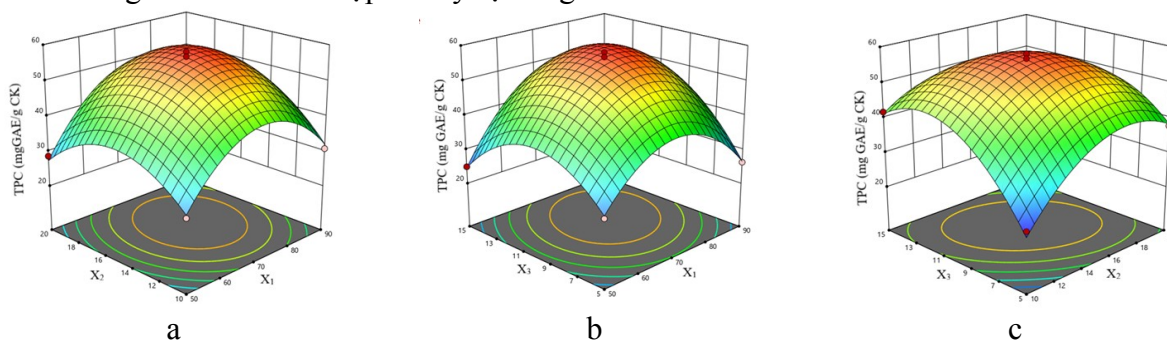
3.2. Các yếu tố chiết xuất ảnh hưởng đến TPC, TFC trong quá trình điều chế cao chiết lá giang

Đồ thị bề mặt đáp ứng trong mô hình BBD được xây dựng từ phương trình hồi quy đa biến. Đồ thị mô tả quan hệ giữa các yếu tố đầu vào (X_1 , X_2 , X_3) và biến đáp ứng (Y) theo từng cặp yếu tố tương tác với nhau trong khi yếu tố còn lại được cố định.

3.2.1. Các yếu tố chiết xuất ảnh hưởng đến hàm lượng TPC

Các cặp yếu tố X ảnh hưởng đến hàm lượng TPC trong quá trình điều chế cao chiết lá giang được thể hiện qua đồ thị bề mặt đáp ứng (Hình 3). Cụ thể như sau, đồ thị hình 3a, tương tác giữa TPC, nồng độ ethanol (X_1) và tỷ lệ dung môi : mẫu (X_2) trong điều kiện cố định thời gian siêu âm, kết quả TPC đạt giá trị tối ưu khi ethanol tăng từ 50% lên khoảng 70 - 80% kết hợp với tỷ lệ dung

môi : mẫu 15: 1 - 20: 1 mL/g, qua đó thấy được vai trò của dung môi ethanol trong việc hòa tan hiệu quả hợp chất phenolic, đồng thời tỷ lệ dung môi cao tạo gradient nồng độ mạnh, thúc đẩy khuếch tán và giải phóng chất tan từ mô thực vật [9]; đồ thị hình 3b, tương tác giữa TPC, nồng độ ethanol (X_1) và thời gian siêu âm (X_3) trong điều kiện cố định tỷ lệ dung môi: mẫu, kết quả TPC tăng khi ethanol đạt 70 - 80% kết hợp với thời gian siêu âm 5 - 10 phút. Điều này phản ánh vai trò kép của ethanol ở nồng độ thích hợp giúp hòa tan hiệu quả polyphenol, trong khi đó siêu âm hỗ trợ phá vỡ cấu trúc tế bào, tăng cường giải phóng các hợp chất sinh học [13]. Tuy nhiên, khi thời gian siêu âm kéo dài quá 15 phút, hiệu quả trích ly có xu hướng giảm nhẹ do hiện tượng phân hủy hoặc biến đổi cấu trúc polyphenol [6]; đồ thị hình 3c, tương tác giữa TPC, tỷ lệ dung môi: mẫu (X_2) và thời gian siêu âm (X_3) trong điều kiện cố định nồng độ ethanol, kết quả cho thấy, TPC đạt cực đại khi tỷ lệ dung môi : mẫu cao (15: 1 - 20: 1 mL/g), kết hợp với thời gian siêu âm vừa phải (10 - 12 phút). Tỷ lệ dung môi lớn tạo gradient nồng độ mạnh, thúc đẩy khuếch tán và hòa tan polyphenol, trong khi siêu âm ở mức vừa phải giúp phá vỡ mô thực vật, giải phóng TPC mà không gây phân hủy [7, 8]. Tuy nhiên, thời gian siêu âm kéo dài làm hiệu quả trích ly giảm nhẹ khả năng chiết xuất TPC [13, 14].



Hình 3. Bề mặt đáp ứng các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng TPC trong cao chiết lá giang. a: Tương quan giữa nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi (thời gian siêu âm 10 phút); b: Tương quan giữa nồng độ ethanol và thời gian siêu âm (tỷ lệ dung môi 15: 1 mL/g); c:

Tương quan giữa tỷ lệ dung môi và thời gian siêu âm (nồng độ ethanol 70%)

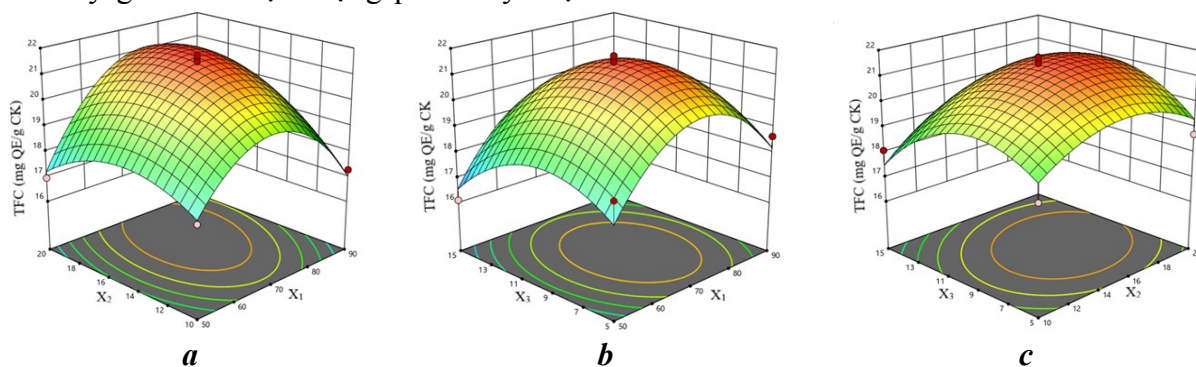
3.2.2. Các yếu tố chiết xuất ảnh hưởng đến hàm lượng TFC

Các cặp yếu tố X ảnh hưởng đến hàm lượng TFC trong quá trình điều chế cao chiết lá giang được thể hiện qua đồ thị bề mặt đáp ứng (Hình 4). Cụ thể như sau, đồ thị hình 4a, tương tác giữa TFC, nồng độ ethanol (X_1) và tỷ lệ dung môi:

Mẫu (X_2) trong điều kiện cố định thời gian siêu âm, kết quả TFC đạt cực đại khi ethanol ở nồng độ 70 - 80% kết hợp với tỷ lệ dung môi : mẫu 15: 1 - 20: 1 mL/g, kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chávez-González và cs (2020) [15] về vai trò của ethanol và tỷ lệ dung môi trong chiết xuất flavonoid; đồ thị hình 4b và 4c

cho thấy, thời gian siêu âm ở mức vừa phải giúp phá vỡ mô thực vật, giải phóng hợp chất sinh học, khi thời gian siêu âm kéo dài hơn 15 phút, hiệu suất trích ly giảm do hiện tượng phân hủy hoặc

biến đổi cấu trúc flavonoid [13]. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Guo và cs (2024) [16] về tối ưu hóa chiết xuất flavonoid có hỗ trợ siêu âm.



Hình 4. Bề mặt đáp ứng các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng TFC trong cao chiết lá giang. a: Tương quan giữa nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi (thời gian siêu âm 10 phút); b: Tương quan giữa nồng độ ethanol và thời gian siêu âm (tỷ lệ dung môi 15: 1 mL/g); c: Tương quan giữa tỷ lệ dung môi và thời gian siêu âm (nồng độ ethanol 70%)

3.3. Tối ưu hóa bề mặt đáp ứng

Kết quả mô hình BBD cho thấy, giá trị TPC tối ưu được dự đoán khoảng 57,499 mg GAE/g CK khi các yếu tố được đặt ở mức nồng độ ethanol 74,16%, tỷ lệ dung môi : mẫu 15,44: 1 và thời gian siêu âm 10,91 phút. Tương tự như vậy, giá trị TFC tối ưu được dự đoán khoảng 21,577 mg QE/g CK tại điều kiện nồng độ ethanol 72,92%, tỷ lệ dung môi: mẫu 16,68: 1 và thời gian siêu âm 10,41 phút. Cả TPC và TFC có các mức yếu tố tác động tối ưu nằm ở gần mức khảo sát cơ sở, cho thấy điểm cực đại nằm trong phạm vi thiết kế thiết kế thí nghiệm ban đầu. Việc các mức tối ưu nằm ở giữa khoảng khảo sát cho thấy mối quan hệ giữa từng yếu tố khảo sát và biến tương tác có dạng không tuyến tính (có thành phần bậc hai), tức là tồn tại một điểm cân bằng giữa khả năng hòa tan và khả năng phân hủy hoặc bão hòa của hợp chất mong muốn trích ly [12]. Từ kết quả của mô hình BBD, tiến hành tối ưu hóa đáp ứng nhằm xác định các yếu tố đầu vào (X_1 : Nồng độ môi ethanol trích ly; X_2 : Tỷ lệ dung môi : mẫu, X_3 : Thời gian siêu âm) sao cho biến đầu ra (Y_1 : TPC; Y_2 : TFC) đạt giá trị tối đa. Kết quả tối ưu hóa đáp ứng thu được giá trị $desirability = 0,974$, với điều kiện tối ưu như sau: Nồng độ ethanol 73,217%, tỷ lệ dung môi : mẫu 15,999: 1 mL/g, thời gian siêu âm 10,543 phút, cho hàm lượng TPC $\approx 57,324$ mg GAE/g CK và TFC $\approx 21,551$ mg QE/g CK. Tuy nhiên, để phù hợp với mô hình thực nghiệm, đã tiến hành hiệu chỉnh lại điều kiện tối ưu như sau: Nồng độ

ethanol 73%; tỷ lệ dung môi : mẫu 16: 1 mL/g; thời gian siêu âm 10,5 phút.

Tiến hành kiểm chứng lại điều kiện tối ưu, thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại ($n = 3$) theo các yếu tố tối ưu mà mô hình dự đoán, hàm lượng TPC và TFC thực nghiệm lần lượt là $57,207 \pm 0,089$ mg GAE/g CK và $21,310 \pm 0,191$ mg QE/g CK, giá trị này được xem là tương đối cao, phản ánh hiệu quả của quy trình chiết xuất tối ưu bằng sóng siêu âm. So sánh với các loài thuộc họ Apocynaceae đã được công bố như lá giang có TPC dao động 41,2 - 49,8 mg GAE/g CK và TFC 15,6 - 18,9 mg QE/g CK [17], hay lá giang đạt TPC 38,5 - 45,7 mg GAE/g CK và TFC 14,2 - 17,5 mg QE/g CK [18]. Như vậy, lá giang thể hiện hàm lượng TPC và TFC vượt trội hơn so với nhiều loài cùng họ. Bên cạnh đó, từ kết quả TPC và TFC thực nghiệm, việc kiểm định hai phía ($\mu \neq \mu_0$) được tiến hành nhằm so sánh giữa kết quả thực nghiệm và mô hình dự đoán. Giá trị thống kê tính toán thống kê tính toán cho thấy, $|t_{TPC}| = 2,285$ và $|t_{TFC}| = 2,182$ đều nhỏ hơn $t_{(0,05;2)} = 4,303$. Trên cơ sở đó kết luận, không có sự tồn tại khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa kết quả thực nghiệm và mô hình dự đoán. Điều này khẳng định sự tương đồng giữa giá trị thực nghiệm và mô hình dự đoán, đồng thời chứng minh tính chính xác và giá trị ứng dụng của mô hình trong việc dự đoán điều kiện tối ưu để thu nhận hàm lượng TPC và TFC trong phạm vi nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh tính phù hợp và độ tin cậy cao của mô hình Box–Behnken trong tối ưu hóa các yếu tố chiết xuất nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi polyphenol tổng (TPC) và flavonoid tổng (TFC) từ lá giang. Mô hình hồi quy đa biến cho thấy khả năng dự đoán chính xác giữa lý thuyết và thực nghiệm, khẳng định giá trị ứng dụng của phương pháp RSM trong nghiên cứu chiết xuất hợp chất sinh học. Kết quả này khẳng định tiềm năng của lá giang như nguồn nguyên liệu giàu hợp chất sinh học, đồng thời cung cấp nền tảng khoa học đáng tin cậy cho việc chuẩn hóa và mở rộng quy trình sản xuất. Trong tương lai, việc đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết tối ưu và nghiên cứu ứng dụng ở quy mô công nghiệp sẽ là hướng đi quan trọng nhằm khai thác giá trị của nguồn dược liệu bản địa này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Dai, L. T., Anh, H. T., Vaka, M., Ngan, D. T., Nam, N. D. (2017). An investigation of aganoerion polymorphum leaf extract as acopper working fluids' additive. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(5B): 236 - 245.
- [2]. Govaerts, R., Nic Lughadha, E., Black, N., Turner, R., Paton, A. (2021). The world checklist of vascular plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. *Scientific data*, 8(1): 215 - 225.
- [3]. Singleton, V. L. & Rossi Jr, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144 - 158.
- [4]. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug analysis*, 10(3): 178 - 182.
- [5]. Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 17, 1 - 10.
- [6]. Biswas, A., Dey, S., Xiao, A., Deng, Y., Birhanie, Z. M., Roy, R., Li, D. (2023). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of antioxidant phenolics from *Corchorus olitorius* leaves: A response surface optimization. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1): 64 - 82.
- [7]. Hiranpradith, V., Therdtai, N., Soontrunnarudrungsri, A., Rungsuriyawiboon, O. (2025). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of total phenolics and flavonoids content from *Centella asiatica*. *Foods*, 14(2): 291 - 310.
- [8]. Muzykiewicz-Szymańska, A., Kucharska, E., Pelech, R., Nowak, A., Jakubczyk, K., Kucharski, Ł. (2024). The optimisation of ultrasound-assisted extraction for the polyphenols content and antioxidant activity on *Sanguisorba officinalis* L. aerial parts using response surface methodology. *Applied Sciences*, 14(20): 9579 - 9598.
- [9]. Wu, Y. L., Zhang, W., Guo, L. D., Zhang, S. Q., Liang, S. Z. (2024). Optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction of polyphenols from *Phyllanthus emblica* by response surface methodology. *Chemical Papers*, 78(1): 221 - 229.
- [10]. Elgudayem, F., Aldiyab, A., Albalawi, M. A., Omran, A., Kafkas, N. E., Saghrouchni, H., Ben Ahmed, C. (2023). Box-Behnken design based optimization of phenolic extractions from *Polygonum equisetiforme* roots linked to its antioxidant and antibacterial efficiencies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1 - 14 .
- [11]. Afoakwah, N. A., Tchabo, W., Owusu-Ansah, P. (2024). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of Jerusalem artichoke tuber bio-active ingredient using optimized conditions of Box-Behnken response surface methodology. *Heliyon*, 10(4): 1 - 13.
- [12]. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5): 965 - 977.
- [13]. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540 - 560.

- [14]. Garcia-Larez, F. L., Esquer, J., Guzmán, H., Zepeda-Quintana, D. S., Moreno-Vásquez, M. J., Rodríguez-Félix, F., Tapia-Hernández, J. A. (2025). Effect of ultrasound-assisted extraction (UAE) parameters on the recovery of polyphenols from pecan nutshell waste biomass and its antioxidant activity. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(7): 10977 - 10995.
- [15]. Chávez-González, M. L., Sepúlveda, L., Verma, D. K., Luna-García, H. A., Rodríguez-Durán, L. V., Ilina, A. & Aguilar, C. N. (2020). Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Processes*, 8(4): 434 - 463.
- [16]. Guo, J., Liu, W., Li, H., Ke, Q., Chen, F., Meng, Q., Kou, X. (2024). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of crude flavonoids from *Moutai distillers* grains and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Foods*, 14(13): 2316 - 2331.
- [17]. Shao, D., Gao, G., Abubakar, A. S., Hazaisi, H., Chen, P., Chen, J., ... & Zhu, A. (2022). Total flavonoids extracts of *Apocynum* L. from the Ili river valley region at different harvesting periods and bioactivity analysis. *Molecules*, 27(21): 7343 - 7357.
- [18]. Abubakar, A. S., Huang, X., Birhanie, Z. M., Gao, G., Feng, X., Yu, C., ... & Zhu, A. (2022). Phytochemical composition, antioxidant, antibacterial, and enzyme inhibitory activities of various organic extracts from *Apocynum hendersonii* (Hook. f.) Woodson. *Plants*, 11(15): 1964 - 1982.

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS FOR *Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire LEAF EXTRACT USING THE BOX-BEHNKEN DESIGN

Phu Thi Thanh Khiet¹, Truong Thi Tu Tran¹, Tran Viet Quyen¹,
Kong Narin¹, Le Thai Anh Thu²

¹*Food and Health Science Department, Kien Giang University*

²*Technique and technology department, Dong Thap Community College*

Abstract

This study aimed to optimize the extraction process of total polyphenols (TPC) and total flavonoids (TFC) from *Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire leaves. The experiment was designed using response surface methodology (RSM) based on a Box–Behnken design (BBD), with three independent variables: ethanol concentration (50 - 90%), solvent-to-sample ratio (10: 1 - 20: 1, mL/g) and ultrasonic time (5 - 15 min). The response variables were TPC (mg GAE/g DW) and TFC (mg QE/g DW). The developed models showed high statistical significance ($P_{\text{model}} < 0.0001$), with non-significant lack of fit ($PTPC = 0.069$; $PTFC = 0.219$) and high coefficients of determination ($R^2 > 98\%$ for both models), confirming their reliability and stability. Linear, quadratic, and interaction effects significantly influenced extraction efficiency, indicating nonlinearity and the presence of maxima within the studied range. The optimal extraction conditions were determined as 73% ethanol, solvent-to-sample ratio of 16: 1 (mL/g) and ultrasonic time of 10.5 min. Experimental validation using two-tailed tests ($\mu \neq \mu_0$) confirmed the accuracy of the predicted models. These findings provide robust scientific evidence for developing an efficient process to produce extracts enriched with bioactive compounds.

Keywords: *Aganonerion polymorphum*, Box–Behnken design, flavonoids, polyphenols, ultrasound-assisted extraction.

Ngày nhận bài: 23/02/2026

Ngày chuyển phản biện: 02/3/2026

Ngày thông qua phản biện: 20/3/2026

Ngày duyệt đăng: 10/4/2026