

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA TRÍCH LY POLYPHENOL TỔNG, FLAVONOID TỔNG TỪ HOA ĐẬU BIẾC (*Clitoria ternatea*) BẰNG MA TRẬN PLACKETT-BRURMAN VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT BOX-BEHNKEN

Trương Văn Xạ¹*, Trần Kim Thoa¹

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng được trích ly từ hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea*). Trên cơ sở thử nghiệm đa yếu tố, nghiên cứu đã xác định 6 yếu tố thí nghiệm được sàng lọc bằng ma trận Plackett-Brurman là tần số siêu âm (kHz), nhiệt độ (°C), giá trị pH, thời gian trích ly (phút), nồng độ ethanol (%) và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w). Kết quả thí nghiệm cho thấy 3 yếu tố tác động mạnh nhất đến hàm lượng polyphenol tổng là tần số siêu âm, pH và thời gian trích ly. Đối với flavonoid tổng, 3 yếu tố tác động mạnh nhất là pH, nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu. Thí nghiệm được thực hiện với 3 yếu tố theo phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken để xác định các giá trị tối ưu. Kết quả, hàm lượng polyphenol tổng được trích ly tối ưu ở tần số siêu âm mixed-frequencies (328 kHz), pH 6,67 và thời gian là 163 phút. Đối với flavonoid tổng tối ưu ở các giá trị là pH 7,0, nồng độ ethanol 68% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 1,5. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa trích ly hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng có kết quả lần lượt là $64,42 \pm 0,38$ mg/g và $56,06 \pm 0,48$ mg/g đều tương đương với dự đoán của mô hình.

Từ khóa: Box-Behnken design, Đậu biếc, flavonoid tổng, Plackett-Brurman design, polyphenol tổng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu biếc (*Clitoria ternatea*) là loại dây leo hoang dại phát triển ở nhiều vùng đất gò thuộc khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Hoa Đậu biếc có màu xanh tím hoặc xanh lam đậm, chứa nhiều sắc tố anthocyanins nên được sử dụng làm màu thực phẩm [2]. Đậu biếc là loại cây dược liệu có nhiều hoạt chất quý giúp phòng và trị bệnh như polyphenols, flavonols, flavonoids, anthocyanins [18, 7].

Ma trận Plackett-Brurman design (PBD) giúp thiết kế và sàng lọc các thí nghiệm đa nhân tố nhằm tiết kiệm thời gian và số lượng các nghiệm thức thực hiện; từ đó giúp phát hiện yếu tố quan trọng cần khảo sát trong nghiên cứu [17]. Trong khi đó, phương pháp đáp ứng bề mặt (Box-Behnken design - BBD) giúp tối ưu hóa giá trị các yếu tố đang được nghiên cứu [15]. Ma trận PBD và phương pháp BBD được sử dụng để tối ưu hóa ở một số nghiên cứu như: quy trình trích axit oleanolic từ rễ cây Trâm ổi (*Lantana camara*) [1]; trích ly hợp chất flavonoid từ hạt Táo gai (*Crataegus monogyna*) [16]; trích ly polyphenols từ lá cây *Paris polyphylla* [13]. Phương pháp trích ly anthocyanins và polyphenol tổng có hỗ

trợ siêu âm của trái cây Thiên thảo (*Rubia sylvatica*) đã được tối ưu theo mô hình toán học PBD và phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) [6]. Nghiên cứu tối ưu hóa được 6 yếu tố quan trọng chi phối thí nghiệm là tần số siêu âm sử dụng trích ly, tỷ lệ nguyên liệu, nồng độ dung môi ethanol, giá trị pH, nhiệt độ và thời gian chiết. Sử dụng phương pháp PBD và RSM để tối ưu hóa quy trình trích ly dầu từ hạt cây Thì là (*Foeniculum vulgare*). Nghiên cứu tối ưu hóa được 3 yếu tố là kích thước hạt, thời gian trích ly, tỷ lệ dung môi [3].

Nghiên cứu này thực hiện nhằm tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol tổng và flavonoid tổng của hoa Đậu biếc trong điều kiện trích ly có hỗ trợ siêu âm bằng ma trận PBD và phương pháp đáp ứng bề mặt BBD. Sản phẩm cao chiết là nguồn nguyên liệu tự nhiên tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp và dược phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, thiết bị

Hoa Đậu biếc trưởng thành được thu hái ở tỉnh Vĩnh Long từ 7-8 giờ sáng. Hoa được rửa sạch và để ráo nước trong điều kiện phòng thí nghiệm trước khi điều chế cao chiết. Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình ly trích polyphenol tổng, flavonoid tổng của hoa Đậu

¹ Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

*Email: xatv@vvlute.edu.vn

biết được thực hiện trong 3 bước: (1) thử nghiệm đa yếu tố, (2) sàng lọc các yếu tố chính theo ma trận PBD, và (3) tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt BBD.

Nghiên cứu sử dụng hệ thống bể siêu âm kích thước 600 x 380 x 350 mm, có kết nối trực tiếp với bộ nguồn phát sóng siêu âm (IDS 2415/SM; Crest Ultrasonic). Bộ nguồn siêu âm có thể phát sóng theo 2 chế độ: (1) phát tần số sóng siêu âm ở ba mức cố định là 58, 132 và 192 kHz bằng nút điều chỉnh; (2) phát sóng siêu âm liên tục (mixed-frequencies) từ mức 178 kHz đến 482 kHz bằng đỉnh ốc điều chỉnh, nếu cố định tần số phát sóng siêu âm nào thì sử dụng nút pull trên đỉnh ốc. Mẫu trích ly được cho vào bể siêu âm sau khi tần số sóng siêu âm đã hoạt động ở mức cài đặt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thử nghiệm đa yếu tố

Điều kiện trích ly ban đầu được thiết lập như sau: 400 ml ethanol 50% và 200 g hoa Đậu biếc (tỷ lệ 2/1, v/w), hỗn hợp được xay nhuyễn bằng máy xay (TOSHIBA BL-T60) trong 5 phút. Hỗn hợp trích ly được điều chỉnh pH 6,0 (sử dụng axit citric). Sau đó, hỗn hợp được cho vào bình tam giác 250 ml và đặt vào hệ thống bể siêu âm có kết nối trực tiếp với bộ nguồn phát sóng siêu âm điều chỉnh ở tần số 192 kHz. Bể siêu âm được kết nối với hệ thống tuần hoàn lạnh hoạt động liên tục nhằm giữ cho nhiệt độ của mẫu trích ly ổn định ở 30°C trong quá trình trích ly. Thời gian trích ly 30 phút. Sau trích ly bằng siêu âm, mẫu dịch chiết được lọc qua Na₂SO₄ khan và làm giàu bằng hệ thống cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C, áp suất 0,095 atm và tốc độ quay 110 vòng/phút (với máy cô quay WEV-1010, bể điều nhiệt tuần hoàn lạnh MaXircu CL-12 và bơm chân không WEV-0095). Sau đó, mẫu được sấy đối lưu (tủ sấy DS-80) ở nhiệt độ 50°C đến khi bay hết dung môi. Các sản phẩm cao chiết được trữ ở -4°C.

Sáu yếu tố khảo sát ảnh hưởng hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng được trích ly từ hoa Đậu biếc gồm: tần số siêu âm (58, 132, 192 kHz), nồng độ ethanol (50, 60, 70, 80, 90 và 100%), tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 và 10/1 v/w), nhiệt độ trích ly (30, 40 50 và 60°C), giá trị pH (5,0, 6,0, 7,0, 8,0) và thời gian trích ly (30, 60, 90, 120 phút). Trong đó, khảo sát yếu tố nào thì yếu tố đó thay đổi còn các yếu tố khác thì không thay đổi sau mỗi lần thử nghiệm; mỗi yếu tố khảo sát 3 lần lặp lại.

2.2.2. Thiết kế ma trận PBD và phương pháp đáp ứng bề mặt BBD

Để xác định được các yếu tố và mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đó đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc thì ma trận PBD được thiết kế với 6 yếu tố gồm: tần số siêu âm (kHz), nhiệt độ (°C), giá trị pH, thời gian trích ly (phút), nồng độ ethanol (%) và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w) (Bảng 1).

Ba yếu tố có ảnh hưởng nhất đến kết quả khảo sát được chọn để tiến hành thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt BBD để xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0, +1) (Bảng 3).

2.2.3. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Dựa vào kết quả thực nghiệm thu được từ thí nghiệm theo BBD của phần mềm Design-Expert 13.0.5.0® đã phân tích và đề xuất các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng, flavonoid tổng là tối ưu dựa trên ba yếu tố khảo sát. Sau đó thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.2.3. Phương pháp xác định polyphenol tổng

Định lượng polyphenol tổng bằng phương pháp sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu [20], có điều chỉnh. Đường chuẩn galic acid với dãy nồng độ 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 mg/ml được chuẩn bị trong methanol. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,1 ml mẫu cao chiết và 1 ml Folin-Ciocalteu 10% để phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ phòng (30±2°C); sau đó thêm 1 ml Na₂CO₃ 2% và ủ tối 45 phút. Mẫu thí nghiệm được tiến hành đo quang phổ hấp thụ tại 765 nm (máy quang phổ LABOMED UV-2602). Hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cao chiết được tính dựa vào đường chuẩn gallic acid (GAE) theo công thức sau: polypenol tổng (mg GAE/g cao chiết) = $\frac{c \times V}{m}$.

Trong đó: c là hàm lượng polyphenol tổng được suy ra từ đường chuẩn gallic acid (mg/ml), V là thể tích dịch chiết (ml), m là khối lượng cao chiết có trong V (g).

2.2.4. Phương pháp xác định flavonoid tổng

Phương pháp định lượng flavonoid tổng, có điều chỉnh [4]. Đường chuẩn quercetin với dãy nồng độ 25, 50, 100, 200, 400 mg/ml được chuẩn bị trong methanol. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 ml mẫu cao chiết và 1,5 ml methanol, để ổn định trong 5 phút. Sau đó, thêm 0,1 ml AlCl₃ 10% và cho phản ứng trong 5 phút. Cuối cùng, thêm 0,1 ml CH₃COOK 1M và 2,8

ml nước cất, lắc đều và để ổn định 45 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu thí nghiệm được đo quang phổ hấp thụ tại 415 nm. Hàm lượng flavonoid tổng trong mẫu cao chiết được tính dựa vào đường chuẩn quercetin (QE) theo công thức sau: flavonoid tổng (mg QE/g cao chiết) = $\frac{c \cdot V}{m}$. Trong đó: c là hàm lượng flavonoid tổng được suy ra từ đường chuẩn quercetin (mg/ml), V là thể tích dịch chiết (ml), m là khối lượng cao chiết có trong V (g).

2.2.5. Xử lý số liệu

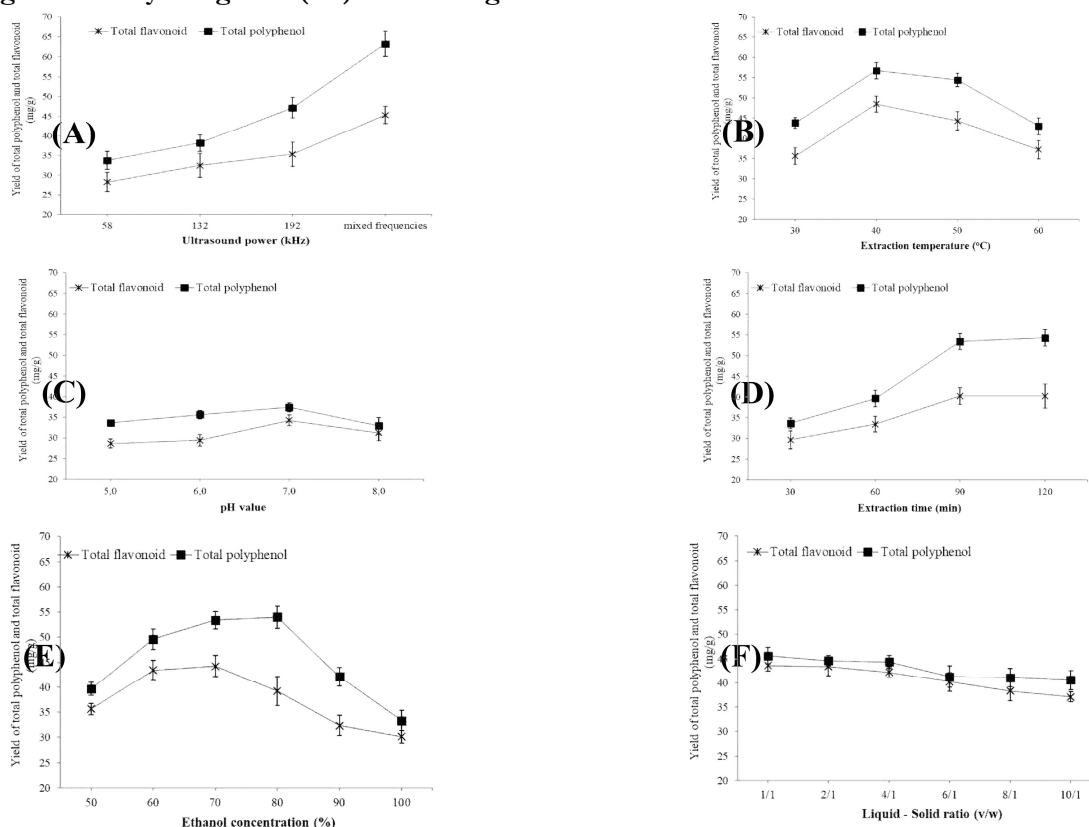
Phần mềm Design-Expert (phiên bản 13.0.5.0[®], Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA) các thử nghiệm một yếu tố, tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các thử nghiệm một yếu tố

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng flavonoid tổng đều thấp hơn polyphenol tổng ở tất cả các yếu tố khảo sát (Hình 1). Hàm lượng flavonoid tổng và polyphenol tổng có xu hướng tăng dần khi tần số sóng siêu âm càng lớn (Hình 1A) và thời gian trích ly càng dài (1D). Xu hướng đó

ngược lại với yếu tố dung môi/nguyên liệu càng lớn thì hàm lượng flavonoid tổng và polyphenol tổng có xu hướng giảm (Hình 1F). Trong khi đó, các yếu tố khác đều chung xu hướng đạt giá trị cao nhất sau đó giảm dần. Cụ thể, nhiệt độ trích ly ở 40°C, sau đó giảm dần đến nhiệt độ khảo sát 60°C (Hình 1B); pH 7,0 đạt giá trị cao nhất (Hình 1C); hàm lượng polyphenol tổng đạt giá trị cao nhất ở ethanol 80%, đối với flavonoid tổng là ethanol 70% (Hình 1E). Kết quả nghiên cứu cho thấy, yếu tố nhiệt độ và nồng độ ethanol tăng thì flavonoid và polyphenol tăng, tuy nhiên nếu nhiệt độ và nồng độ ethanol tiếp tục tăng thì flavonoid và polyphenol giảm. Kết quả tương đồng với kết quả nghiên cứu hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ trái cây Thiên thảo (*Rubia sylvatica*) và lá cây Phong đại (*Acer saccharum*) đạt giá trị cao nhất ở nồng độ ethanol 60% và thời gian trích ly 50 phút sau đó giảm nếu hai yếu tố này tiếp tục tăng [5, 6]. Tương tự kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid tổng được trích ly từ cám gạo đen và gạo tím (*Oryza sativa* L.) cũng có xu hướng đạt giá trị cao nhất ở nồng độ ethanol 70% và thời gian trích ly 60 phút [8].



Hình 1. Kết quả khảo sát tần số siêu âm (A), nhiệt độ (B), pH (C), thời gian (D), nồng độ ethanol (E) và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (F) ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc

3.2. Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng nhất đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng ma trận PBD

Từ kết quả khảo sát hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các thử nghiệm đa yếu tố thì các giá trị của từng yếu tố sẽ được chọn để tiến hành đánh giá mức độ ảnh hưởng bằng ma trận PBD. Mỗi yếu tố xác định 2 giá trị ở vị trí xung quanh hàm

lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng đạt giá trị cao nhất. Giá trị từng yếu tố lần lượt: siêu âm (192 kHz và phát sóng siêu âm liên tục), nhiệt độ (40°C và 50°C), pH (6,0 và 7,0) và thời gian (90 phút và 120 phút) (Hình 1). Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc được thực hiện theo bằng ma trận PBD với 12 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm 3 lần lặp lại (Bảng 1).

Bảng 1. Yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng ma trận PBD

Thí nghiệm	Các yếu tố						Hàm lượng	
	Tần số siêu âm (kHz)	Nhiệt độ (°C)	pH	Thời gian (phút)	Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ (v/w)	Polyphenol tổng (mg/g)	Flavonoid tổng (mg/g)
1	192	40	6,0	120	60	2/1	37,21 ± 2,01	45,59 ± 2,01
2	192	40	6,0	90	60	1/1	32,09 ± 0,96	60,13 ± 2,35
3	192	50	7,0	90	70	2/1	35,37 ± 1,10	44,47 ± 1,70
4	192	50	6,0	120	70	1/1	38,29 ± 1,34	39,02 ± 1,37
5	192	40	7,0	90	70	2/1	42,66 ± 1,21	50,27 ± 1,30
6	192	50	7,0	120	60	1/1	46,32 ± 0,86	63,02 ± 2,06
7	phát sóng siêu âm liên tục	40	6,0	90	70	1/1	37,54 ± 1,64	44,14 ± 0,86
8	phát sóng siêu âm liên tục	50	7,0	90	60	1/1	49,72 ± 1,33	66,42 ± 2,11
9	phát sóng siêu âm liên tục	50	6,0	90	60	2/1	43,34 ± 2,04	49,96 ± 0,96
10	phát sóng siêu âm liên tục	40	7,0	120	60	2/1	52,83 ± 1,90	53,62 ± 1,49
11	phát sóng siêu âm liên tục	40	7,0	120	70	1/1	59,12 ± 0,79	56,65 ± 1,60
12	phát sóng siêu âm liên tục	50	6,0	120	70	2/1	55,72 ± 1,09	42,30 ± 2,03

Kết quả phân tích thống kê ANOVA của 6 yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng (p -value = 0,0339) và flavonoid tổng (p -value = 0,0327) trích ly từ hoa Đậu biếc bằng ma trận PBD đều có ý nghĩa thống kê mức $p < 0,05$. Nếu p -value của một yếu tố trong thống kê ANOVA của ma trận PBD là số dương càng nhỏ, có nghĩa là yếu tố đó ảnh hưởng càng nhiều ở mức cao và ngược lại [6]. Do đó, có thể căn cứ vào p -value (chọn các hệ số có giá trị tuyệt đối nhỏ hơn 0,05) để xác định được yếu tố chi phối mạnh đến kết quả của mô hình.

Kết quả phân tích thống kê ANOVA đã xác định được 3/6 yếu tố có tác động mạnh nhất đến hàm lượng polyphenol tổng là tần số siêu âm (p -value = 0,0078), pH (p -value = 0,0427) và thời gian (p -value = 0,0254) đều có p -value $< 0,05$. Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu về xác định 3 yếu tố là tần số siêu âm, thời gian trích ly và giá trị pH ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol được trích ly từ cám gạo đen và gạo tím tại Ấn Độ [8]. Hàm lượng

polyphenol tổng được trích ly từ bắp cải tím (*Zea mays* L. var. *ceratina*) tại Thái Lan bị chi phối mạnh bởi 3 yếu tố là tần số siêu âm, thời gian trích ly và giá trị pH được chọn cho thiết kế thí nghiệm BBD [14].

Tương tự như trên, kết quả phân tích thống kê ANOVA đã xác định được 3/6 yếu tố có tác động mạnh nhất đến hàm lượng flavonoid tổng là pH (p -value = 0,0187), nồng độ ethanol (p -value = 0,0106) và tỷ lệ (p -value = 0,0392). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu xác định nồng độ dung môi ethanol và tỷ lệ nguyên liệu ảnh hưởng lớn đến hàm lượng flavonoids được trích ly từ 5 loài chanh leo (*Passiflora* sp.) phổ biến ở Brazil [11]. Như vậy, 3 yếu tố ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng flavonoid tổng là pH, nồng độ ethanol và tỷ lệ được chọn cho thiết kế thí nghiệm BBD.

Kết quả phương trình tuyến tính được xác định trong ma trận PBD lần lượt: Polyphenol tổng: $Y = + 44,18 + 5,53A + 0,6092B + 3,49C + 4,06D + 0,5992E + 0,3375F$. Flavonoid tổng: $Y = + 51,30 + 0,8825A -$

0,4342B + 4,44C – 1,27D – 5,16E – 3,60F. Trong đó: A là tần số siêu âm, B là nhiệt độ, C là pH; D là thời gian; E là nồng độ ethanol; F là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

3.3. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken design (BBD).

Dựa vào kết quả phân tích thống kê ANOVA của ma trận PBD thì 3 yếu tố có ảnh hưởng nhất đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng được chọn để tiến hành thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt BBD để xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0, +1) (Bảng 2).

Bảng 2. Ba yếu tố khảo sát và các giá trị ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng phương pháp đáp ứng bề mặt BBD

Mức khảo sát	Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng			Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid tổng		
	Tần số siêu âm (kHz)	pH	Thời gian (phút)	pH	Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ (v/w)
-1	132	5,0	60	5,0	50	0,5/1
0	192	6,0	120	6,0	60	1/1
+1	phát sóng siêu âm liên tục	7,0	180	7,0	70	2/1

Kết quả tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng từ thực nghiệm với 15 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design Expert 13.0.5.0® (Bảng 3). Kết quả phân tích thống kê ANOVA cho 3 yếu tố tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng phương pháp BBD có giá trị *p*-value của mô hình là 0,0020 (có ý nghĩa mức 5%); sự không phù hợp (Lack of Fit) là 38,68 (không ý nghĩa). Hệ số hồi quy (R^2) của mô hình là 0,9783, nghĩa là có 97,83% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình; trong khi đó, giá trị R^2 dự đoán (0,8369) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9468) với độ lệch 0,1099 (nhỏ hơn 0,2). Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 10,217 (lớn hơn 4 rất nhiều), 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 4,02, cho thấy mô hình đáng tin cậy. 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 [6]. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy mô hình tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng có các thí nghiệm được thực hiện là đáng tin cậy.

Phương trình bậc hai được dùng như mô hình để dự đoán hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ hoa Đậu biếc là:

$$\text{Polyphenols} = + 54,53 + 4,26A + 2,93B + 0,4338C + 5,50AB + 1,62BC + 3,32A^2 - 6,79 B^2$$

Trong đó: A là tần số siêu âm, B là nhiệt độ, C là pH, D là thời gian, E là nồng độ ethanol, F là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

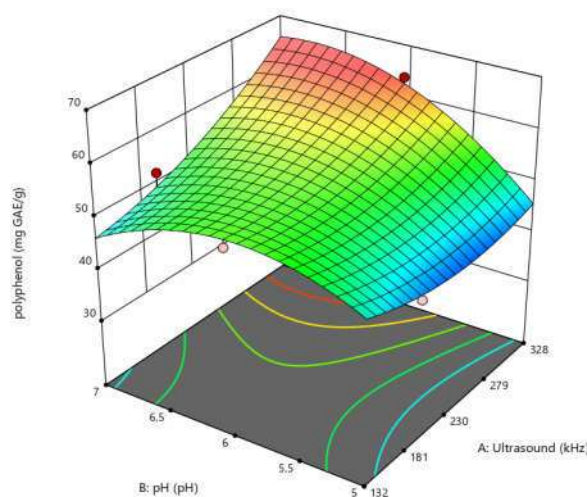
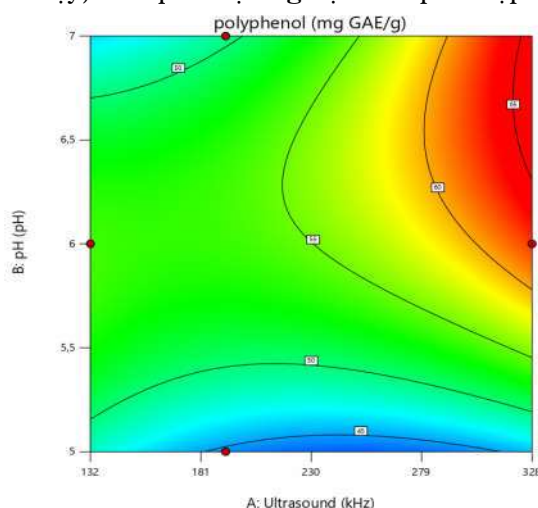
Bảng 3. Bố trí thí nghiệm theo phương pháp BBD để tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng trích ly từ hoa Đậu biếc

Thí nghiệm thứ	Các yếu tố			Hàm lượng polyphenol tổng (mg/g)
	Tần số siêu âm (kHz)	pH	Thời gian (phút)	
1	132	6,0	180	52,52 ± 0,96
2	192	6,0	120	50,44 ± 1,16
3	192	7,0	180	52,09 ± 1,80
4	phát sóng siêu âm liên tục	7,0	120	62,22 ± 0,79
5	132	6,0	60	55,22 ± 2,12
6	phát sóng siêu âm liên tục	5,0	120	47,56 ± 1,33
7	phát sóng siêu âm liên tục	6,0	60	61,33 ± 1,52
8	132	5,0	120	51,60 ± 0,76
9	phát sóng siêu âm liên tục	6,0	180	63,74 ± 1,76

10	132	7,0	120	$41,45 \pm 1,82$
11	192	5,0	60	$45,02 \pm 0,75$
12	192	5,0	180	$43,67 \pm 1,81$
13	192	7,0	60	$46,98 \pm 0,53$
14	192	6,0	120	$53,89 \pm 1,32$
15	192	6,0	120	$54,39 \pm 1,70$

Kết quả mô hình đáp ứng bề mặt cho thấy hàm lượng polyphenol tổng càng tăng khi giá trị tần số siêu âm càng tăng; ngược lại giảm khi giá trị pH nhỏ hơn 6,0 (Hình 2). Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Das và cs (2017); Muangrat và cs (2018) đều xác định tần số siêu âm là yếu tố chi phối mạnh nhất đến hàm lượng polyphenol được trích ra từ cám gạo đen và bắp tím (*Zea mays* L. var. *ceratina*) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM [8, 14]. Tần số siêu âm cao có khả năng gây xâm thực do các chu kỳ co giãn của vật liệu. Những chu kỳ này phá vỡ thành tế bào của vật liệu và điều này thuận lợi cho sự xâm nhập và truyền dung môi thẩm thấu vào bên trong vật liệu, do đó tăng tốc độ trích ly [9, 14]. Như vậy, kết quả thực nghiệm rất phù hợp với kết

quả mô hình, các kết quả này đáng tin cậy và tìm ra được tần số siêu âm phù hợp là yếu tố ảnh hưởng nhất đến quá trình trích ly polyphenol tổng từ hoa Đậu biếc. Tuy nhiên, biểu đồ đáp ứng bề mặt bằng chưa đạt được điểm hội tụ cao, do đó nghiên cứu tiếp tục chọn một thí nghiệm mà phần mềm Design Expert 13.0.5.0[®] tư vấn để chọn được giá trị tối ưu. Các giá trị tối ưu xác định dựa vào hàm lượng polyphenol tổng cao nhất và các giá trị của ba biến khảo sát là số tròn và có khả năng thực nghiệm kiểm định được. Kết quả chọn được hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất ở $65,739 \pm 1,979$ mg/g với các giá trị tư vấn từ phần mềm là tần số siêu âm ở mức phát sóng siêu âm liên tục (328 kHz), pH 6,67 và thời gian là 163 phút.



Hình 2. Bề mặt đáp ứng của polyphenol tổng theo tần số siêu âm và giá trị pH bằng phần mềm Design Expert

Kết quả tối ưu hóa hàm lượng flavonoid tổng từ thực nghiệm với 15 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design Expert 13.0.5.0[®] (Bảng 4). Kết quả thống kê ANOVA cho 3 yếu tố tối ưu hóa hàm lượng flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc bằng phương pháp BBD có giá trị *p*-value của mô hình là 0,0137 (có ý nghĩa mức 5%); sự không phù hợp (Lack of Fit) là 11,36 (không ý nghĩa). Hệ số R^2 là 0,9607. Giá trị R^2 dự đoán (0,8341) phù hợp với R^2 điều chỉnh (0,9351) với độ lệch 0,101. Tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 11,316, điều đó chứng tỏ tín hiệu đã đầy đủ để sử dụng dự đoán hàm lượng flavonoid. Ngoài ra, hệ số

%CV của mô hình là 4,13. Như vậy, kết quả thực nghiệm rất phù hợp với kết quả của mô hình tối ưu hóa hàm lượng flavonoid.

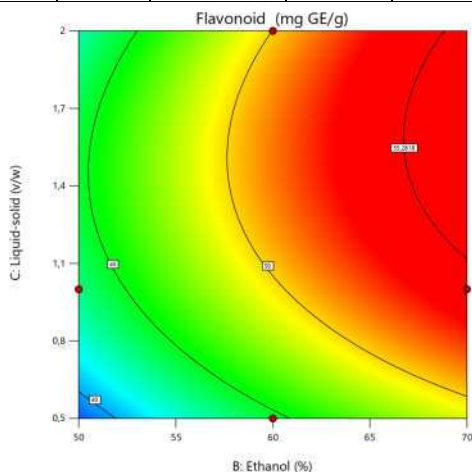
Phương trình bậc hai được dùng như mô hình để dự đoán hàm lượng flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc là:

$$\text{Flavonoids} = + 48,04 + 1,05A + 3,70B + 3,77C + 2,13AB - 1,04AC + 0,8116BC + 1,89 A^2 - 0,7779 - 3,69 C^2$$

Trong đó: A là tần số siêu âm, B là nhiệt độ, C là pH, D là thời gian, E là nồng độ ethanol, F là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu.

Bảng 4. Bố trí thí nghiệm theo phương pháp BBD để tối ưu hóa hàm lượng flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc

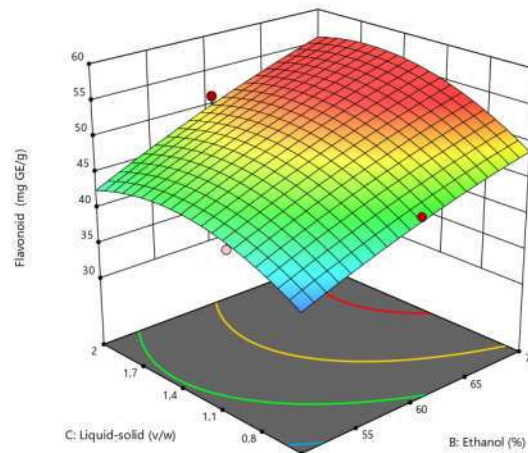
Thí nghiệm thứ	Các yếu tố			Hàm lượng flavonoid tổng (mg/g)
	pH	Nồng độ ethanol (%)	Tỷ lệ (v/w)	
1	7,0	60	0,5/1	45,23 ± 1,26
2	6,0	60	1/1	45,42 ± 0,56
3	7,0	60	2/1	51,31 ± 0,33
4	5,0	70	1/1	48,23 ± 1,73
5	6,0	50	0,5/1	37,39 ± 0,89
6	6,0	50	2/1	42,12 ± 1,20
7	6,0	60	1/1	48,47 ± 1,02
8	7,0	50	1/1	42,48 ± 0,66
9	5,0	60	0,5/1	38,45 ± 0,83
10	5,0	50	1/1	45,89 ± 0,70
11	5,0	60	2/1	49,98 ± 1,46
12	6,0	70	2/1	51,30 ± 2,04
13	6,0	70	0,5/1	43,49 ± 0,70
14	6,0	60	1/1	45,23 ± 1,43
15	7,0	70	1/1	53,34 ± 0,85



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

Hiện nay, việc sử dụng sóng siêu âm trong quá trình trích ly, thu nhận các hợp chất, đặc biệt là các hợp chất có hoạt tính sinh học từ các nguồn khác nhau đang được quan tâm, do tính chất thuận tiện, hiệu quả trích ly cao, dung môi tiêu thụ ít, dễ vận hành, chi phí thấp và ít ảnh hưởng đến môi trường. Sóng siêu âm có tần số càng thấp thì năng lượng càng cao, do đó tần số siêu âm thường được chọn để trích ly các hợp chất hoạt tính sinh học từ thực vật trong khoảng 20 - 45 kHz. Trong đó, một số nghiên cứu đã đạt được kết quả trích ly các hợp chất sinh học tốt ở tần số siêu âm vừa phải [10, 12, 19]. Golmohamadi và cs. (2013) nghiên cứu về sử dụng sóng siêu âm tần số 20, 490 và 986 kHz để trích ly hợp chất phenolic tổng và anthocyanin từ quả mâm

Các yếu tố trong thí nghiệm tối ưu hóa hàm lượng flavonoid tổng có sự tương tác với nhau từng cặp và được biểu đồ đáp ứng bề mặt bằng phần mềm Design Expert 13.0.5.0[®] (Hình 3). Tuy nhiên, kết quả mô hình đáp ứng bề mặt của hàm lượng flavonoid tổng chưa đạt được điểm hội tụ cao, do đó nghiên cứu tiếp tục chọn một mô hình phần mềm Design Expert 13.0.5.0[®] tư vấn để chọn được giá trị tối ưu. Các giá trị tối ưu xác định dựa vào hàm lượng polyphenol tổng cao nhất và các giá trị của ba biến khảo sát là số tròn và có khả năng thực nghiệm kiểm định được. Kết quả chọn được hàm lượng flavonoid tổng đạt cao nhất ở 55,097 ± 1,459 mg/g với các giá trị các yếu tố lần lượt là pH 7,0, ethanol 68% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 1,5.



xôi đỏ [10]. Kết quả nghiên cứu đã xác định được hàm lượng phenolic tổng được trích ly ở tần số 20, 490 và 986 kHz sau 30 phút trích ly lần lượt là 1628 ± 30, 1097 ± 60 và 1228 ± 38 mg/l, khác biệt không ý nghĩa ở mức 95%. Trong khi đó, hàm lượng anthocyanin trích ly ở tần số 986 kHz lớn hơn và khác biệt ý nghĩa so với hai tần số còn lại; tần số 20 và 490 kHz khác biệt không ý nghĩa mức 95%. Tần số xử lý siêu âm 20 kHz là hiệu quả nhất để trích ly các hợp chất hoạt tính sinh học; bên cạnh đó, nghiên cứu đã xác định được có thể sử dụng tần số siêu âm 490 kHz với thời gian phù hợp để trích ly hợp chất hoạt tính sinh học từ quả mâm xôi đỏ [10]. Karabegović và cs. (2018) nghiên cứu về sử dụng sóng siêu âm tần số 42, 211, 1038 kHz để trích ly phenolic tổng và

flavonoid tổng từ lá cây Sen đá (*Sempervivum marmoreum* L.) [12]. Kết quả ở tần số 42, 211, 1038 kHz sau 150 phút trích ly thì hàm lượng phenolic tổng lần lượt là $84,6 \pm 2,99$, $65,2 \pm 2,13$ và $40,5 \pm 0,72$ mg/g; hàm lượng flavonoid tổng lần lượt là $18,8 \pm 0,31$, $17,9 \pm 1,36$, $12,7 \pm 0,37$ mg/g. Nghiên cứu đã xác định ở mức tần số 42 kHz và 211 kHz khác biệt không ý nghĩa thống kê mức 95%. Nghiên cứu đã xác định bên cạnh việc sử dụng tần số siêu âm thấp để trích ly hợp chất sinh học từ lá cây sen đá thì tần số siêu âm vừa phải (211 kHz) cũng được lựa chọn với thời gian trích ly là 150 phút.

3.4. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa trích ly hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trích ly từ hoa Đậu biếc

Theo mô hình dự đoán thì hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất ($65,739 \pm 1,979$ mg/g) với các giá trị các yếu tố lần lượt là tần số siêu âm ở mức phát sóng siêu âm liên tục (328 kHz), pH 6,67 và thời gian là 163 phút. Kiểm định mô hình thực tế hàm lượng polyphenol tổng được thực hiện theo quy trình đề xuất với 3 lần lặp lại (Bảng 5). Trong đó, hàm lượng polyphenol tổng được xác định là $64,42 \pm 0,38$ mg/g tương đương so với mô hình dự đoán là $65,739 \pm 1,979$ mg/g. Do đó, kết quả đề xuất tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol tổng từ hoa đậu biếc của mô hình BBD là hoàn toàn phù hợp và đáng tin cậy.

Bảng 5. Kiểm định mô hình thực tế trích ly polyphenol tổng và flavonoid tổng từ hoa Đậu biếc

	Lặp lại 1	Lặp lại 2	Lặp lại 3	Trung bình
Polyphenol tổng (mg/g)	64,32	64,09	64,84	$64,42 \pm 0,38$
Flavonoid tổng (mg/g)	55,59	56,54	56,04	$56,06 \pm 0,48$

Theo mô hình dự đoán thì hàm lượng flavonoid tổng đạt cao nhất ($55,097 \pm 1,459$ mg/g) ở các giá trị các yếu tố lần lượt là pH 7,0, ethanol 68% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 1,5. Kiểm định mô hình thực tế hàm lượng flavonoid tổng được trích ly từ hoa Đậu biếc được trình bày trong bảng 8. Trong đó, hàm lượng flavonoid tổng được xác định là $56,06 \pm 0,48$ mg/g cao hơn so với mô hình dự đoán.

4. KẾT LUẬN

Sáu yếu tố thử nghiệm ban đầu được sàng lọc và chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng nhất đến hàm

lượng polyphenol tổng (tần số siêu âm, giá trị pH, thời gian) và hàm lượng flavonoid tổng (pH, nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu) bằng ma trận Plackett-Burman. Kết quả bề mặt đáp ứng Box-Behnken của hàm lượng polyphenol tổng theo đề xuất từ phần mềm Design Expert với các giá trị từng yếu tố lần lượt là: tần số siêu âm ở mức phát sóng siêu âm liên tục (328 kHz), pH 6,67 và thời gian trích ly là 163 phút. Thực tế thí nghiệm thu được hàm lượng polyphenol tổng được xác định là $64,42 \pm 0,38$ mg/g tương đương với giá trị mô hình ước tính. Trong khi đó, bề mặt đáp ứng Box-Behnken của hàm lượng flavonoid tổng với các giá trị từng yếu tố lần lượt là: pH 7,0, ethanol 68% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 1,5. Thực tế thí nghiệm thu được hàm lượng flavonoid tổng được xác định là $56,06 \pm 0,48$ mg/g cao hơn giá trị mô hình ước tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Banik, R. M., & Pandey, D. K. (2008). Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. *Industrial crops and products*, 27(3), 241-248.
2. Bishoyi, A. K., & 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.
3. Boudraa, H., Kadri, N., Mouni, L., & Madani, K. (2021). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from fennel seeds: Optimization using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 23, 100307. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100307>
4. 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>
5. Chen, F., Zhang, Q., Fei, S., Gu, H., & Yang, L. (2017). Optimization of ultrasonic circulating extraction of samara oil from *Acer saccharum* using combination of Plackett-Burman design and Box-Behnken design. *Ultrasonics sonochemistry*, 35, 161-175.

6. 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>
7. 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>
8. Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. *Industrial Crops and Products*, 95, 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.041>
9. Espada-Bellido, E., Ferreira-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food chemistry*, 219, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.122>
10. Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1316-1323. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.020>
11. Gomes, S. V., Portugal, L. A., dos Anjos, J. P., de Jesus, O. N., de Oliveira, E. J., David, J. P., & David, J. M. (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal*, 132, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>
12. Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., & Lazić, M. L. (2018). Direct ultrasound-assisted extraction and characterization of phenolic compounds from fresh houseleek (*Sempervivum marmoreum* L.) leaves. *Hemijiska industrija*, 72 (1), 13-21. <https://doi.org/10.2298/HEMIND170402017K>
13. Mohd, T., Belwal, T., Bhatt, I. D., Pande, V., & Nandi, S. K. (2018). Polyphenolics in leaves of Paris polyphylla: An important high value Himalayan medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 117, 66-74.
14. Muangrat, R., Pongsirikul, I., & Blanco, P. H. (2018). Ultrasound assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from dried cob of purple waxy corn using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (2), e13447. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13447>
14. Myers, R. H., Khuri, A. I., & Carter, W. H. (1989). Response surface methodology: 1966-1988. *Technometrics*, 31(2), 137-157.
15. Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19 (3), 486-490.
16. Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
17. 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>
18. Trương Văn Xạ, Nguyễn Trung Trực, Huỳnh Thị Phương Thảo (2021). Ảnh hưởng của sóng siêu âm lên hàm lượng anthocyanins trích ly từ bắp cải tím (*Brassica oleracea* var. capitata) và rau dền đỏ (*Amaranthus tricolor*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 3-4: 82-87.
19. Yadav, R. N. S., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 3(12).

**STUDY OPTIMIZATION OF TOTAL POLYPHENOL, TOTAL FLAVONOID FROM FLOWER
Clitoria ternatea EXTRACT USING THE DESIGN OF PLACKETT-BURMAN MATRIX AND
THE RESPONSE SURFACE METHODOLOGY BOX-BEHNKEN**

Truong Van Xa, Tran Kim Thoa

Summary

This study aims at identifying the optimal values of different factors directly influencing the total polyphenol and total flavonoid from flower *Clitoria ternatea* extract. On the basis of multi-factor experiment, six factors were screened using a Plackett-Burman experimental design to determine the variables that significantly influence the extraction yield of total polyphenol and total flavonoid, namely ultrasound power, extraction temperature, pH value, extraction duration, ethanol concentration and liqui/solid ratio. Results showed that the ultrasound power mixed-frequencies, pH value and extraction duration had the strongest influences on the total polyphenol. For total flavonoid, pH value, ethanol concentration and liqui/solid ratio. These three factors were subsequently optimized using the response surface methodology Box-Behnken. Optimal values of the ultrasound power mixed-frequencies, pH 6.67 value and extraction duration 163 min had the total polyphenol; pH 7.0 value, ethanol 68% and and liqui/solid ratio 1.5 had the total flavonoid. These values formed a model which was tested; results total polyphenol and total flavonoid were 64.42 ± 0.38 mg/g and 56.06 ± 0.48 mg/g, respectively.

Keywords: *Box-Behnken design, Clitoria ternatea, flavonoids, Plackett-Burman design, polyphenols.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Anh Đức

Ngày nhận bài: 15/10/2021

Ngày thông qua phản biện: 15/11/2021

Ngày duyệt đăng: 22/11/2021