

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH POLYPHENOL CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA TỪ LÁ HỒNG SIM (*Rhodomryrtus tomentosa*)-PHÚ QUỐC

Huỳnh Kim Yên<sup>1,2</sup>, Nguyễn Trọng Tuân<sup>1</sup>, Trần Thanh Mến<sup>1\*</sup>, Trương Thị Tú Trân<sup>3</sup>, Trần Hoàng Lâm<sup>4</sup>, Lê Bích Tuyền<sup>3</sup>, Huỳnh Văn Quốc Cảnh<sup>3</sup>, Lê Huỳnh Như<sup>1</sup> và Trần Vĩ Khang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang

<sup>3</sup>Khoa Khoa học thực phẩm và sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang

<sup>4</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Cửu Long

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Mến (email: ttmen@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 16/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 07/06/2022

Ngày duyệt đăng: 13/06/2022

### Title:

Study on the extraction process of polyphenols with antioxidant activity from leaves of *Rhodomryrtustomentosain* Phu Quoc

### Từ khóa:

Chiết tách, chống oxy hóa, polyphenol, *Rhodomryrtus tomentosa*, tối ưu

### Keywords:

Antioxidant, extraction, optimization, polyphenols, *Rhodomryrtustomentosa*

### ABSTRACT

The present study reports a multivariable optimization of response surface method-assisted extraction of polyphenols from *Rhodomryrtus tomentosa* leaves. The parameters of ethanol concentration, extraction temperature, extraction time, and material/solvent ratio have been optimized. According to the models, the optimal extraction conditions were: 90% of ethanol, the extraction time of 22 hours, the extraction temperature of 59°C, and a material/solvent ratio of 1/20 (g/mL). Under the optimized conditions, the extraction yield of the polyphenols from *Rhodomryrtus tomentosa* leaves was 410.45±2.49 mg GAE/g extract, which was in agreement with the predicted value (409.62 mg GAE/g extract). The optimal extract of *Rhodomryrtus tomentosa* leaves was able to neutralize 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl free radicals ( $EC_{50}= 11.79 \mu\text{g/mL}$ ). Therefore, *Rhodomryrtus tomentosa* leaves can be used as a novel source of natural polyphenols that have applications as antioxidants in the pharmaceutical industries.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này, sự tối ưu hóa đa biến trong quá trình chiết tách polyphenol từ lá hồng sim với sự hỗ trợ của phương pháp đáp ứng bề mặt. Các thông số về nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết tách, thời gian chiết tách và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đã được tối ưu hóa. Theo các mô hình, điều kiện chiết tách tối ưu là: ethanol 90%, thời gian chiết tách 22 giờ, nhiệt độ chiết tách 59°C và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL). Trong các điều kiện tối ưu, hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá Hồng sim là 410,45±2,49 mg GAE/g cao chiết, phù hợp với giá trị dự đoán (409,62 mg GAE/g cao chiết). Cao tối ưu của lá hồng sim có khả năng trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl ( $EC_{50}=11,79 \mu\text{g/mL}$ ). Do đó, lá hồng sim có thể được sử dụng như một nguồn polyphenol tự nhiên mới có các ứng dụng tiềm tàng như chất chống oxy hóa trong ngành công nghiệp dược phẩm.

## 1. GIỚI THIỆU

Ở Phú Quốc, hồng sim là loài cây rất phổ biến, thường mọc ở ven biển, trong rừng tự nhiên, ven sông suối, trong các rừng ngập nước, rừng ẩm ướt và tại độ cao đến 2400 m so với mực nước biển. Phú Quốc là nơi có vị trí địa lý khá phù hợp cho cây hồng sim phát triển. Cây hồng sim không chỉ mang lại giá trị kinh tế cho địa phương về du lịch mà quả được dùng làm rượu và nhiều sản phẩm có giá trị khác chẳng hạn như: mỹ phẩm, mứt và thức uống có cồn (Liu et al., 2012; Yên và ctv., 2015). Bên cạnh đó, hồng sim còn mang lại giá trị dược liệu. Dịch chiết lá và quả hồng sim có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy ở tôm (Lựa và ctv., 2015) và vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm (Limsuwan et al., 2012; Mitsuwan et al., 2020). Ở lá chứa hàm lượng polyphenol cao hơn búp và quả, do đó, lá cho hoạt tính chống oxy hóa cao hơn (Abd Hamid et al., 2017). Nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng, polyphenol có khả năng chống oxy hóa. Trong cơ thể, các gốc oxy hóa là thủ phạm chính gây ra những rối loạn thoái hóa đầy nhanh quá trình lão hóa cơ thể, gây bệnh ung thư, da, lão hóa da. Polyphenol có khả năng chống oxy hóa cao nhờ hạn chế sự hình thành các gốc tự do, tăng cường sức đề kháng, hạn chế sự phát triển của các tế bào ung thư; tác dụng chống các tia phóng xạ. Điều này cho thấy, lá hồng sim không chỉ có tiềm năng ứng dụng cao trong dược phẩm, thực phẩm mà còn mở ra ứng dụng quan trọng như mỹ phẩm. Ở các vùng địa lý khác nhau sẽ có hệ sinh thái khác nhau và đặc thù cho vùng địa lý đó. Điều này dẫn đến sự khác biệt về hệ thống động, thực vật mà đặc biệt là thành phần và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, hiện nay nghiên cứu về quy trình tách chiết polyphenol từ lá hồng sim ở Phú Quốc còn hạn chế. Để khai thác lợi ích của chúng một cách tối ưu, các thành phần hóa học có hoạt tính sinh học có trong lá hồng sim vẫn cần được nghiên cứu sâu hơn và hướng tới thương mại hóa sản phẩm ra thị trường, đặc biệt đối với Phú Quốc.

Hiện nay, để tìm ra điều kiện chiết xuất các hợp chất thiên nhiên từ thực vật một cách hiệu quả, các nhà khoa học thường sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt. Đây là một phương pháp đơn giản không những giúp tiết kiệm thời gian bố trí thí nghiệm mà còn có khả năng dự đoán gần chính xác kết quả thí nghiệm (Aourabi et al., 2020; Nittaya et al., 2021). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt vào trong quá trình chiết tách polyphenol từ lá hồng sim. Từ đó, xác định được điều kiện chiết tách polyphenol một cách

tối ưu, hiệu quả mà vẫn tiết kiệm được dung môi, nguyên liệu và thời gian.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây hồng sim khoảng 3 năm tuổi được thu lấy lá nguyên, không sâu bệnh vào tháng 2 năm 2022, tại huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang. Mẫu lá hồng sim được thu hái ngoài tự nhiên bằng kéo và bảo quản trong túi nhựa. Sau đó, mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm của Trường Đại học Kiên Giang. Hồng sim được định danh bằng phương pháp so sánh hình thái thân, lá, hoa và quả dựa trên mô tả trong bộ sách “Cây cỏ Việt Nam” (Hộ, 2003) và “Những cây thuốc và vị thuốc của Việt Nam” (Lợi, 2009). Mẫu lá hồng sim sau khi được thu hái về sẽ được rửa sạch và sấy ở 55°C đến khi khối lượng không thay đổi. Tiếp đó, lá hồng sim được xay thành bột mịn và bảo quản ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thiết bị: cân phân tích (AB104-S, Mettler Toledo, Thụy Sĩ), tủ sấy (BE 200, Memmert, Đức), bể ủ (Mettmert, Đức), máy vortex (ZX3, Velp, Ý), micropipette (Thermo Labsystems), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức).

Hóa chất: ethanol (Chemsol Việt Nam), methanol (Chemsol, Việt Nam), sodium carbonate (Xilong, China), gallic acid (Merck), Folin-Ciocalteu’s phenol reagent (Merck), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich), dimethyl sulfoxide (Merck).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Xác định độ ẩm nguyên liệu

Mẫu lá tươi thu về được xác định trọng lượng và tiến hành sấy ở 100°C cho đến khi trọng lượng không đổi. Độ ẩm của nguyên liệu là sự chênh lệch giữa trọng lượng tươi và trọng lượng khô được tính theo công thức sau:

$$X = (P - A) / P \times 100\%$$

Trong đó:

+ P là số gram của mẫu thử trước khi sấy,

+ A là số gam mẫu thử sau khi sấy.

#### 2.2.2. Xác định loại dung môi chiết tách polyphenol thích hợp

Bột lá hồng sim được ngâm chiết lần lượt trong các dung môi methanol, ethanol, acetone và nước với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/mL), nhiệt

độ trích ly 30°C trong thời gian 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc và cô đuổi dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết sẽ được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol theo mô tả trong Mục 2.2.5.

### 2.2.3. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng polyphenol

#### *Xác định nồng độ dung môi ly trích thích hợp*

Bột lá hồng sim được ly trích với loại dung môi được chọn ở thí nghiệm trên với nồng độ dung môi (% v/v) khác nhau bằng phương pháp ngâm chiết. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/mL), nhiệt độ trích ly 30°C trong thời gian 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc và cô đuổi dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết sẽ được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol (Mục 2.2.5).

#### *Xác định tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thích hợp*

Bột lá hồng sim ngâm chiết với nồng độ dung môi thích hợp xác định được ở thí nghiệm trên với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/5, 1/10, 1/20, 1/30 và 1/40 (g/mL) với nhiệt độ trích ly 30°C trong 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc và cô đuổi dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết sẽ được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol (Mục 2.2.5).

#### *Xác định nhiệt độ chiết tách thích hợp*

Bột lá Hồng sim ngâm chiết với nồng độ dung môi thích hợp đã được xác định ở thí nghiệm trên với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/mL) ở các nhiệt độ chiết tách lần lượt là 40, 50, 60, 70 và 80°C trong 24 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc và cô đuổi dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết sẽ được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol (Mục 2.2.5).

#### *Xác định thời gian chiết tách thích hợp*

Bột lá Hồng sim ngâm chiết với nồng độ dung môi thích hợp đã được xác định ở thí nghiệm trên với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/mL) ở nhiệt độ 30°C trong thời gian chiết tách lần lượt là 6, 12, 24, 36 và 48 giờ. Sau đó, dịch chiết được tiến hành lọc và cô đuổi dung môi thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết sẽ được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol (Mục 2.2.5)

### 2.2.4. Xác định điều kiện chiết tách tối ưu polyphenol

Sau khi tiến hành khảo sát các yếu tố, những yếu tố chính có ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng polyphenol trong cao lá hồng sim được sử dụng để

xây dựng quy trình chiết tách tối ưu hóa. Phương pháp đáp ứng bề mặt theo mô hình Box-Behnken với đa yếu tố và ba cấp độ trong phần mềm Design Expert 11.0 được sử dụng để thiết kế thí nghiệm và đánh giá mô hình. Sau khi đã xác định được các điều kiện chiết xuất tối ưu, lá hồng sim được tiến hành chiết cao tối ưu để định lượng polyphenol và khảo sát hoạt tính chống oxy hóa (Mục 2.2.5 và 2.2.6).

### 2.2.5. Phương pháp định lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo mô tả của Akkol et al. (2008) sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL cao chiết và 0,1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu (0,5N), lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bão hòa rồi ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 765 nM. Kết quả được thể hiện bằng miligam đương lượng gallic acid trên gam cao chiết (mg GAE/g cao chiết).

### 2.2.6. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa

Hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của mẫu được xác định theo mô tả của Fu et al. (2002). Hỗn hợp phản ứng gồm 100 µL 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (6×10<sup>-4</sup> M) và 100 µL cao tối ưu ở các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút và đo độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nm. Vitamin C được sử dụng như chất đối chứng dương.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>) của mẫu được xác định theo mô tả bởi Nenadis et al. (2004). Hỗn hợp phản ứng gồm 10 µL cao chiết (hoặc chất chuẩn) và 990 µL gốc tự do ABTS<sup>•+</sup> được ủ trong vòng 06 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp sau khi ủ được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

Hiệu quả trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO<sup>•</sup>) của mẫu được xác định theo mô tả của Mahmud et al. (2017). Hỗn hợp phản ứng gồm 1mL sodium nitroprusside 10 mM, 500 µL buffer phosphate và 500 µL cao chiết, ủ ở 25°C trong 120 phút. Sau đó, 500 µL dung dịch ủ được phối trộn với 500 µL thuốc thử Griess (1 % sulphanilamide, 2 % acetic acid và 0,1 % naphthyl ethylene diamine dihydrochloride). Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 546 nm.

Năng lực khử sắt (RP) của cao chiết được xác định theo phương pháp của Padma et al. (2013). Hỗn hợp gồm 500 µL cao chiết (hoặc chất chuẩn) ở các nồng độ khảo sát khác nhau, 500 µL đệm phosphate và 500 µL K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> được ủ ở 50°C trong

20 phút. Sau đó, Hỗn hợp được bổ sung thêm 500  $\mu\text{L}$   $\text{CCl}_3\text{COOH}$  10% và ly tâm 3000 vòng/10 phút. Năm trăm  $\mu\text{L}$  lớp trên cho vào eppendorf, bổ sung 500  $\mu\text{L}$  nước cất và 100  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  0,1%. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 700 nm.

Phương pháp phosphomolybdenum (TAC): Tổng chất kháng oxy hóa được xác định theo phương pháp của Prieto et al. (1999). Hỗn hợp phản ứng gồm 100  $\mu\text{L}$  mẫu thử ở các nồng độ khảo sát được cho vào 900  $\mu\text{L}$  dung dịch A gồm có  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,6M, sodium phosphate 28 mM, ammonium molybdate 4 mM. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ  $95^\circ\text{C}$  trong 90 phút, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 695 nm.

Hoạt tính chống oxy hóa của cao tói ưu lá hồng sim sẽ được so sánh với cao chưa tói ưu lá hồng sim. Cao chưa tói ưu lá hồng sim được chiết xuất bằng phương pháp ngâm chiết trong ethanol 99,5% với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (g/mL) trong 24 giờ ở nhiệt độ là  $30^\circ\text{C}$ . Sau đó, dung môi được tiến hành lọc dịch chiết, cô đui dung môi thu được cao chưa tói ưu lá hồng sim. Trong nghiên cứu này, cao chưa tói ưu lá hồng sim được gọi ngắn gọn là cao lá hồng sim.

### 2.2.7. Xử lý và phân tích số liệu

Kết quả thực nghiệm được nhập liệu và tính toán phân tích của các nghiệm thức được lặp lại 3 lần, xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2017. Kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SE giá trị sai số thực hiện trên phần mềm Microsoft Excel 2017. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được thực hiện đánh giá bằng phương pháp thống kê ANOVA 1 biến ( $\alpha = 5\%$ ) trên phần mềm Minitab 16. Mô hình tối ưu hóa quy trình chiết tách polyphenol được thiết kế và xử lý bằng phần mềm Design Expert 11.0.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

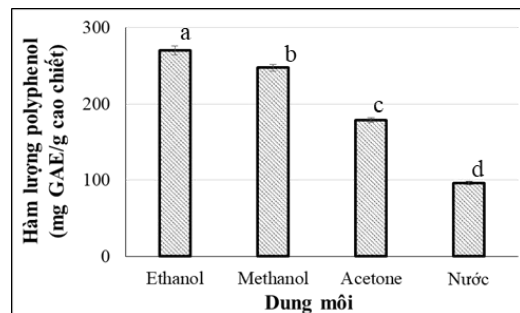
### 3.1. Xác định độ ẩm nguyên liệu

Độ ẩm của lá hồng sim chính là lượng nước có trong mẫu được tính toán dựa trên sự chênh lệch giữa trọng lượng tươi và trọng lượng khô. Trong nghiên cứu này, độ ẩm của lá hồng sim được xác định là  $75,16\% \pm 3,05$ .

### 3.2. Xác định loại dung môi chiết tách polyphenol thích hợp

Dung môi được lựa chọn phù hợp sẽ giúp tăng hiệu suất chiết tách, giảm chi phí và thời gian. Các loại dung môi như methanol, ethanol, acetone và nước thường được sử dụng phổ biến để chiết tách

các hợp chất thiên nhiên (Thiyagarajan et al., 2013). Hàm lượng polyphenol trong lá hồng sim chiết tách với các loại dung môi khác nhau được trình bày trong Hình 1. Trong số các dung môi được sử dụng để chiết tách polyphenol, ethanol được chứng minh là tốt nhất. Hàm lượng polyphenol thu nhận được khi chiết tách bằng dung môi ethanol 99,5% là  $270,18 \pm 5,73$  mg GAE/g cao chiết. Do đó, ethanol sẽ được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo. Ethanol được biết đến là một dung môi thân thiện với môi trường, tương đối an toàn với sức khỏe con người (Shi et al., 2003).



**Hình 1. Hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim bằng các dung môi khác nhau**

Ghi chú: Các ký tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng polyphenol

Trong các nghiên cứu trước đây, việc phối trộn ethanol với nước có thể làm tăng hiệu suất ly trích các hợp chất thiên nhiên (Liu et al., 2008). Trong nghiên cứu này, ethanol đã được pha loãng với nước để thu được các môi trường dung môi có độ phân cực khác nhau, nhằm tìm ra nồng độ ethanol thích hợp trong quá trình chiết tách polyphenol từ lá hồng sim. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim được trình bày trong Bảng 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá hồng sim tăng  $77,94$  mg GAE/g cao chiết từ nồng độ ethanol 50% đến 90%. Hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá hồng sim ở nồng độ ethanol 99,5% là  $271,24 \pm 0,78$  mg GAE/g cao chiết, giảm  $30,29$  mg GAE/g cao chiết so với nồng độ ethanol 90%. Trong nghiên cứu của Xiaoa et al. (2008) cho thấy hàm lượng flavonoid (một nhóm hợp chất thuộc nhóm polyphenol) chiết tách được từ loài *Radix astragali* ở nồng độ ethanol 90% là hiệu quả nhất. Trong khảo sát này, nồng độ ethanol từ 80 đến 99,5% được chọn để đưa vào thiết kế mô hình chiết tách tối ưu.

**Bảng 1. Hàm lượng polyphenol dưới sự tác động của các yếu tố đơn**

Yếu tố	Hàm lượng polyphenol (TPC) dưới sự tác động của các yếu tố đơn						
	50	60	70	80	90	99,5	
Nồng độ ethanol (%)	50	60	70	80	90	99,5	
TPC (mg GAE/g cao chiết)	223,59 <sup>f</sup> ±2,04	276,45 <sup>d</sup> ±0,46	280,56 <sup>c</sup> ±1,47	287,62 <sup>b</sup> ±2,01	301,52 <sup>a</sup> ±1,41	271,24 <sup>e</sup> ±0,78	
Nhiệt độ chiết tách (°C)	30	40	50	60	70	80	
TPC (mg GAE/g cao chiết)	270,85 <sup>f</sup> ±0,80	284,67 <sup>e</sup> ±0,60	296,74 <sup>c</sup> ±0,31	321,54 <sup>a</sup> ±0,97	312,94 <sup>b</sup> ±0,54	294,26 <sup>d</sup> ±0,90	
Thời gian chiết tách (giờ)	6	12	18	24	30	36	
TPC (mg GAE/g cao chiết)	248,42 <sup>d</sup> ±3,37	255,66 <sup>c</sup> ±2,40	263,77 <sup>b</sup> ±2,16	271,24 <sup>a</sup> ±2,18	257,34 <sup>c</sup> ±2,46	246,78 <sup>d</sup> ±2,40	
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/mL)	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30	
TPC (mg GAE/g cao chiết)	268,94 <sup>c</sup> ±1,18	271,24 <sup>bc</sup> ±0,85	273,46 <sup>ab</sup> ±1,38	274,57 <sup>a</sup> ±0,44	274,75 <sup>a</sup> ±1,05	274,88 <sup>a</sup> ±0,96	

Ghi chú: Các ký tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Nhiệt độ chiết tách là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng lớn đến hiệu suất cũng như hoạt tính của các hợp chất thiên nhiên. Nhiệt độ cao có thể làm mềm mô thực vật, tăng tốc độ thâm thấu, khuếch tán của dung môi vào trong nguyên liệu và giúp quá trình chiết tách diễn ra nhanh hơn (Dutra et al., 2008). Tuy nhiên, nếu quá trình chiết tách diễn ra ở nhiệt độ quá cao thì dẫn đến sự biến tính, làm giảm hoạt tính của các hợp chất thiên nhiên (Lu et al., 2011). Do đó, nhiệt độ được lựa chọn thích hợp là một việc làm cần thiết để chiết tách hiệu quả các hợp chất thiên nhiên. Hàm lượng polyphenol được chiết tách từ lá hồng sim có xu hướng tăng dần từ 270,85±0,80 mg GAE/g cao chiết ở nhiệt độ 30°C lên 321,54±0,97 mg GAE/g cao chiết ở nhiệt độ 60°C. Hàm lượng polyphenol được chiết tách từ lá hồng sim có xu hướng giảm khi nồng độ chiết tách vượt quá 60°C. Hàm lượng polyphenol được chiết tách từ lá hồng sim ở nhiệt độ 80°C là 294,26±0,90 mg GAE/g cao chiết giảm 27,28 mg GAE/g cao chiết. Trong nghiên cứu của Lu et al. (2011), hàm lượng polyphenol được chiết tách từ vỏ rễ của loài *Wikstroemia indica* ở nhiệt độ 60°C là hiệu quả nhất. Trong khảo sát này, nhiệt độ từ 50 đến 70°C được chọn để đưa vào thiết kế mô hình chiết tách tối ưu polyphenol từ lá hồng sim.

Trong quá trình chiết tách các hợp chất thiên nhiên, thời gian chiết tách quá dài có thể dẫn đến sự phân hủy của các hợp chất thiên, giảm hoạt tính sinh học (Cho et al., 2009). Trong nghiên cứu này, thời gian chiết tách polyphenol trong lá hồng sim từ 6 đến 36 giờ đã được xác định và trình bày trong Bảng 1. Hàm lượng polyphenol ở thời gian 6 giờ là 248,42 ± 3,37 mg GAE/g cao chiết tăng lên 271,24 ± 2,18 mg GAE/g cao chiết sau 24 giờ ngâm chiết. Hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim bị giảm khi kéo dài thời gian ngâm quá 24 giờ. Cụ thể, sau 36 giờ chiết tách, hàm lượng polyphenol là 246,78±2,40 mg GAE/g cao chiết giảm 22,82 mg GAE/g cao chiết. Thời gian từ 18 đến 30 giờ được sử dụng để đưa vào xây dựng mô hình chiết tách tối ưu polyphenol từ lá hồng sim.

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được lựa chọn phù hợp giúp tiết kiệm được dung môi, nguyên liệu và chi phí chiết tách. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được khảo sát ở 6 mức từ 1/5 đến 1/30 (g/mL). Hàm lượng polyphenol từ tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/5 đến 1/20 đã tăng 5,63 mg GAE/g cao chiết. Tuy nhiên, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi khi tiếp tục tăng từ 1/20 đến 1/30 thì lại có xu hướng ổn định, tăng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ). Xiaoa et al. (2008) và Chen et al. (2009) đã chứng minh, khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đạt đến mức bão hòa thì việc tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi sẽ làm hao hụt dung môi mà không mang lại hiệu quả chiết tách cao. Chính vì vậy, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20 (g/mL) được cố định trong quá trình xây dựng mô hình chiết tách tối ưu polyphenol từ lá hồng sim. Trong nghiên cứu của Lu et al. (2011), hàm lượng polyphenol chiết tách được từ vỏ rễ của loài *Wikstroemia indica* ở tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL) là hiệu quả nhất.

### 3.4. Kết quả xác định điều kiện chiết tách tối ưu polyphenol

Dựa vào kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến hàm lượng polyphenol, dung môi ethanol được chọn có nồng độ từ 70 đến 99,5%, nhiệt độ từ 50 đến 70°C và thời gian từ 18 đến 30 giờ để xây dựng quy trình chiết tách tối ưu polyphenol trong lá hồng sim. Trong đó, yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL) được cố định trong quá trình tối ưu. Bởi vì, trong khảo sát ảnh hưởng đơn của yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thì hàm lượng polyphenol thu được thay đổi không đáng kể ( $p > 0,05$ ) khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi vượt quá 1/20 (g/mL). Các nghiệm thức được thiết kế dựa vào phần mềm Design Expert 11.0 theo mô hình Box-Behnken và trình bày trong Bảng 2. Dựa vào 17 nghiệm thức thu nhận được từ mô hình Box-Behnken, qua quá trình thực nghiệm, hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim được ghi nhận dao động từ 117,92 ± 2,12 mg GAE/g cao chiết ở

nghiệm thứ 14, đến  $408,82 \pm 0,96$  mg GAE/g cao chiết ở nghiệm thứ 2. Hàm lượng polyphenol chênh lệch giữa nghiệm thứ cao nhất và thấp nhất là 290,90 mg GAE/g cao chiết. Hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá hồng sim ghi nhận được cao nhất là ở 5 nghiệm thứ trung tâm (từ nghiệm thứ 1 đến nghiệm thứ 5). Năm nghiệm thứ trung tâm được chiết tách ở thời gian 24 giờ, nhiệt độ 60°C, nồng độ ethanol là 90% và tỷ lệ nguyên liệu dung môi là 1/20 (g/mL) cho thấy hàm lượng polyphenol thu nhận được khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ).

Dựa vào kết quả thực nghiệm, phương trình đa thức bậc 2 được xây dựng giúp hỗ trợ dự đoán được hàm lượng polyphenol có thể chiết tách từ lá hồng sim ở các điều kiện khác nhau như sau:  $Y = -9643,36175 + 24,01327 \times A + 189,97965 \times B + 92,66923 \times C - 0,067229 \times A \times B + 0,025333 \times A \times C - 0,006625 \times B \times C - 0,468764 \times A^2 - 1,60714 \times B^2 - 0,509970 \times C^2$ .

Ghi chú: Y là hàm lượng polyphenol dự đoán thu được (mg GAE/g cao chiết). A là thời gian, B là nhiệt độ, C là nồng độ ethanol.

**Bảng 2. Mô hình bố trí thí nghiệm và hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá hồng sim**

Nghiệm thứ	Điều kiện				Hàm lượng polyphenol (mg GAE/g cao chiết)	
	A (giờ)	B (°C)	C (%)	D (w/v)	Thực nghiệm	Dự đoán
1	24	60	90	1/20	406,42 <sup>a</sup> ±1,10	407,61
2	24	60	90	1/20	408,82 <sup>a</sup> ±0,96	407,61
3	24	60	90	1/20	408,71 <sup>a</sup> ±1,14	407,61
4	24	60	90	1/20	407,51 <sup>a</sup> ±0,74	407,61
5	24	60	90	1/20	406,71 <sup>a</sup> ±0,39	407,61
6	24	70	100	1/20	155,04 <sup>b</sup> ±1,09	155,22
7	24	50	100	1/20	257,76 <sup>c</sup> ±1,04	258,29
8	24	70	80	1/20	135,37 <sup>i</sup> ±1,43	134,84
9	24	50	80	1/20	235,44 <sup>f</sup> ±1,60	235,26
10	36	60	100	1/20	299,93 <sup>b</sup> ±0,34	300,11
11	12	60	100	1/20	300,71 <sup>b</sup> ±0,49	299,82
12	36	60	80	1/20	271,44 <sup>d</sup> ±1,17	272,33
13	12	60	80	1/20	284,38 <sup>c</sup> ±1,58	284,20
14	36	70	90	1/20	117,92 <sup>j</sup> ±2,12	117,56
15	12	70	90	1/20	138,77 <sup>i</sup> ±1,40	139,48
16	36	50	90	1/20	236,16 <sup>e</sup> ±0,64	235,45
17	12	50	90	1/20	224,74 <sup>f</sup> ±0,67	225,10

Ghi chú: A là thời gian, B là nhiệt độ, C là nồng độ ethanol và D là tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi. Các ký tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Hàm lượng polyphenol thu nhận được từ phương trình dự đoán và thực nghiệm là tương đương nhau, kết quả được trình bày trong Bảng 2. Phương trình đa thức bậc 2 dự đoán hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim có hệ số tương quan cao ( $R^2=0,9999$ ) và hệ số biến động nhỏ ( $CV=0,4025\%$ ), từ đó cho thấy mô hình có độ tin cậy cao. Ngoài ra, giá trị Lack of Fit (Sự thiếu phù hợp) (0,5042) của mô hình lớn hơn 0,5 cho thấy mô

hình dự đoán rất phù hợp với thực nghiệm. Các nghiên cứu của Aourabi et al. (2020) và Nittayaet al. (2021) cho thấy mô hình chiết tách mà có hệ số tương quan lớn hơn 0,9, hệ số biến động nhỏ hơn 10% và giá trị Lack of Fit lớn hơn 0,5 thì có khả năng ứng dụng khá cao.

Sự tương tác giữa các yếu tố trong quá trình chiết tách polyphenol từ lá hồng sim cũng đã được

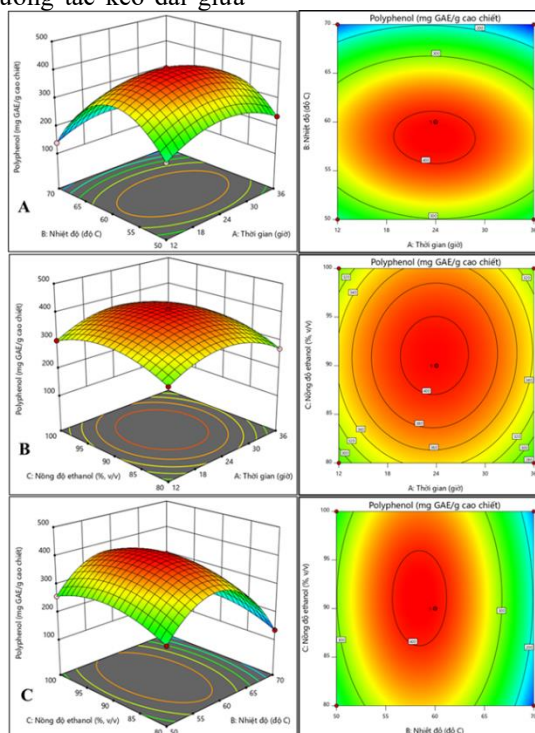
**Bảng 3. Phân tích sự tương tác giữa các yếu tố trong kiểm định ANOVA**

Nguồn	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value
Model	1,723E+05	9	19144,80	15486,11	<0,0001
A-Thời gian	66,99	1	66,99	54,19	0,0002
B-Nhiệt độ	20706,13	1	20706,13	16749,05	<0,0001
C-Nồng độ ethanol	942,00	1	942,00	761,98	<0,0001
AB	260,34	1	260,34	210,59	<0,0001
AC	36,97	1	36,97	29,90	0,0009
BC	1,76	1	1,76	1,42	0,2722
A <sup>2</sup>	19185,35	1	19185,35	15518,91	<0,0001
B <sup>2</sup>	1,088E+05	1	1,088E+05	87970,68	<0,0001
C <sup>2</sup>	10950,29	1	10950,29	8857,62	<0,0001
Residual	8,65	7	1,24		
Lack of Fit	3,55	3	1,18	0,9290	0,5042
Pure Error	5,10	4	1,28		
Cor Total	1,723E+05	16			

Dựa vào Bảng 3 và phương trình đa thức bậc 2, sự kết hợp giữa các yếu tố nhiệt độ, thời gian, nồng độ ethanol mang lại cả tác động tích cực và tiêu cực đến hàm lượng polyphenol trong lá hồng sim. Khi sử dụng hợp lý thời gian (A), nhiệt độ (B), nồng độ ethanol (C) và kết hợp một cách hợp lý giữa thời gian và nồng độ ethanol (AC) sẽ mang lại tác động tích cực, có nghĩa là làm tăng hàm lượng polyphenol. Ngược lại, khi quá lạm dụng các yếu tố thời gian (A<sup>2</sup>), nhiệt độ (B<sup>2</sup>) và nồng độ ethanol (C<sup>2</sup>) hay sự tương tác kéo dài giữa yếu tố thời gian và nhiệt độ cao (AB) hay sự tương tác kéo dài giữa

nhiệt độ và nồng độ ethanol (BC) có thể dẫn đến tác động tiêu cực, có nghĩa là làm suy giảm hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá Hồng sim.

Các bề mặt đáp ứng về hàm lượng polyphenol chiết tách từ lá hồng sim dưới sự tác động giữa các yếu tố được biểu diễn dưới dạng đồ thị 2D được trình bày trong Hình 2. Các đồ thị bề mặt đáp ứng đều có dạng hình vồng, cho thấy hàm lượng polyphenol thu được cao nhất ở một thời gian, nhiệt độ và nồng độ ethanol nhất định.

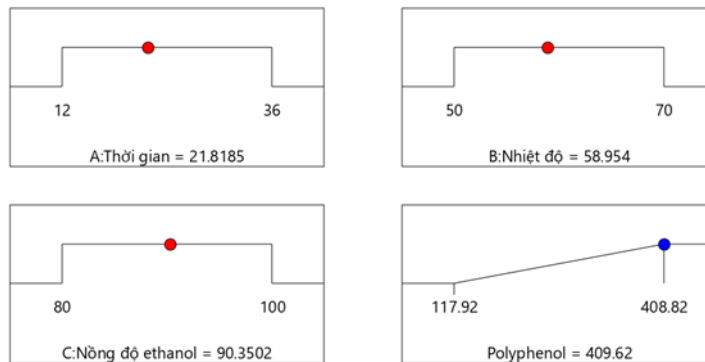


**Hình 2. Đồ thị 2D biểu diễn sự tương tác giữa các yếu tố**

Dựa vào các giá trị thực nghiệm, mô hình Box-Behnken xác định quy trình chiết tách tối ưu polyphenol từ lá hồng sim (Hình 3). Lá Hồng sim được ngâm chiết với dung môi ethanol 90,35% trong 21,82 giờ, ở nhiệt độ là 58,95°C với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL) thì hàm lượng polyphenol dự đoán thu được là 409,62 mg GAE/g cao chiết. Các điều kiện chiết tách polyphenol từ lá hồng sim của mô hình đã được kiểm chứng bằng thực nghiệm với điều kiện cụ thể như sau: lá hồng sim được ngâm chiết với dung môi ethanol 90% trong 22 giờ ở nhiệt độ là 59°C với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL) thì hàm lượng polyphenol thực tế thu được là 410,45±2,49 mg GAE/g cao chiết. Như vậy, hàm lượng polyphenol chiết tách được từ lá hồng sim giữa mô hình dự đoán

và mô hình thực nghiệm được xác định là khác biệt không nhiều.

Từ kết quả nghiên cứu của Yên và ctv (2015), điều kiện tối ưu hóa của dịch chiết từ lá hồng sim thu hái tại Hải Dương với nồng độ ethanol 65%, nhiệt độ 45°C và thời gian 30 phút, có hàm lượng polyphenol là 76,42 mg GAE/g DW. Trong nghiên cứu này, các điều kiện tối ưu hóa của quy trình chiết tách polyphenol được tính toán dựa trên hàm lượng cao chiết thu được và có sự khác nhau như mô tả ở trên. Tuy nhiên, hàm lượng polyphenol thu được tính trên khối lượng bột khô là 164,18mg GAE/g DW cao hơn so với kết quả nghiên cứu đã công bố. Vì vậy, nghiên cứu này đã xác định thành công các điều kiện chiết tách tối ưu polyphenol từ lá hồng sim.



**Hình 3. Quy trình chiết xuất tối ưu và hàm lượng polyphenol tối ưu dự đoán thu được**

**3.5. Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của cao tối ưu lá hồng sim**

Gốc tự do được xác định là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh tật nguy hiểm đối với sức khỏe của con người. Các nghiên cứu chiết xuất hợp chất thiên nhiên để bảo vệ con người khỏi tác hại của gốc tự do luôn thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học (Ninon et al., 2019). Trong nghiên cứu này, kết quả đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện ở các phương pháp như DPPH, ABTS<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, RP, TAC của cao lá hồng sim được chiết tách theo các điều kiện tối ưu và chiết tách bình thường (Bảng 4). Kết quả cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa của cao tối ưu lá hồng sim có khả năng trung hòa gốc tự do và năng lực khử cao hơn cao lá hồng sim trong các phương pháp thử nghiệm. Khả năng trung hòa 50% gốc tự do DPPH của cao tối ưu lá hồng sim được xác định là 11,79 µg/mL cao hơn nghiên cứu của Ab Kareem et al. (2021) với giá trị EC<sub>50</sub>=12,37±1,73µg/mL. Theo nghiên cứu của Blois (1958), hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết được xem là mạnh khi giá trị EC<sub>50</sub> hoặc Abs<sub>0,5</sub> thấp

hơn 50 µg/mL là chất kháng oxy hóa rất mạnh. Như vậy, cao tối ưu lá hồng sim có thể được xem là có hoạt tính chống oxy hóa rất mạnh thể hiện ở các phương pháp thử nghiệm ABTS<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, RP, TAC vì có giá trị EC<sub>50</sub> hoặc Abs<sub>0,5</sub> lần lượt là 6,40 µg/mL; 55,93 µg/mL; 25,67; 43,89. Tuy nhiên, hoạt tính chống oxy hóa của cao tối ưu lá hồng sim thể hiện ở phương pháp DPPH vẫn yếu hơn vitamin C (EC<sub>50</sub>=3,54 µg/mL) là 3,33 lần.

**Bảng 4. Hoạt tính kháng oxy hóa của cao tối ưu lá hồng sim và cao lá hồng sim**

Phương pháp thử nghiệm	Giá trị EC <sub>50</sub> (µg/mL)/Abs <sub>0,5</sub>	
	Cao tối ưu lá hồng sim	Cao lá hồng sim
DPPH	11,79±0,32	17,46±0,16
ABTS <sup>+</sup>	6,40±0,09	11,04±0,90
NO <sup>•</sup>	55,93±0,80	61,91±0,44
RP	25,67±0,09	64,09±1,83
TAC	43,89±0,13	61,51±0,90

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



#### 4. KẾT LUẬN

Phương pháp đáp ứng bề mặt đã được áp dụng để thiết kế thí nghiệm chiết tách polyphenol từ lá hồng sim. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng polyphenol ( $410,45 \pm 2,49$  mg GAE/g cao chiết) trong lá hồng sim được chiết tách tối ưu bằng phương pháp ngâm dầm trong ethanol 90% ở 59°C trong 22 giờ với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/mL). Kết quả nghiên cứu giúp xác định sự tương tác giữa các biến trong mô hình là có ý nghĩa

( $p < 0,05$ ). Trong điều kiện này, hàm lượng polyphenol dự đoán trong thực nghiệm và mô hình gần như giống nhau. Cao tối ưu lá hồng sim được chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa rất mạnh thể hiện ở bốn phương pháp kháng oxy hóa với giá trị  $EC_{50} \leq 50$   $\mu$ g/mL.

#### LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Kiên Giang đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này với mã số đề tài A2022-KHTPSK-04.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ab. Kareem, A., Kamarudin, E., Jusril, N. A., Halim, H., Hussain, R. M., & Bahari, M. (2021). In vitro Cytotoxicity and Antioxidant Study of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. Ethanolic Leaf Extract on LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. In vitro, 33(41B), 42-52. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i41B32343>
- Akkol, E. K., Göger, F., Koşar, M., & Başer, K. H. C. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, 108(3), 942-949. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.11.07.
- Aourabi, S., Sfaira, M., & Mahjoubi, F. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenol content from *Zea mays* hairs (Waste). *The Scientific World Journal*, 1-10. DOI: 10.1155/2020/5072938.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of stable free radicals. *Nature*, 181(4617), 1199-2000. <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Chen, R., Meng, F., Zhang, S., & Liu, Z. (2009). Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 340-346. DOI: 10.1016/j.seppur.2008.12.026.
- Cho, S. Y., Lee, Y. N., & Park, H. J. (2009). Optimization of ethanol extraction and further purification of isoflavones from soybean sprout cotyledon. *Food Chemistry*, 117(2), 312-317. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.00.
- Dutra, R., Leite, M., & Barbosa, N. (2008). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of pterodon emarginatus vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(4), 606-614. DOI: 10.3390/ijms9040606.
- Fu, H. Y., Shieh, D. E., & Ho, C. T. (2002). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids*, 9(1), 35-43. DOI:10.1111/j.1745-4522.2002.tb00206.x.
- Hamid, H. A., Mutazah, S. S. Z. R., & Yusoff, M. M. (2017). *Rhodomyrtus tomentosa*: a phytochemical and pharmacological review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(1), 10-16. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i1.127.
- Limsuwan, S., Kayser, O., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Antibacterial activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract against clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 116. DOI:10.1155/2012/697183.
- Liu, B., Shen, B., Guo, F., & Chang, Y. (2008). Optimization of supercritical fluid extraction of dl-tetrahydropalmatine from rhizome of *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang with orthogonal array design. *Separation and Purification Technology*, 64(2), 242-246. DOI: 10.1016/j.seppur.2008.10.003.
- Liu, G. L., Guo, H. H., & Sun, Y. M. (2012). Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. and identification of anthocyanins in the extract using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6292-6302. DOI: 10.3390/ijms13056292.
- Lu, C. L., Li, Y. M., Fu, G. Q., Yang, L., Jiang, J. G., Zhu, L., & Lin, Q. S. (2011). Extraction optimisation of daphnoretin from root bark of *Wikstroemia indica* (L.) C.A. and its anti-tumour activity tests. *Food Chemistry*, 124(4), 1500-1506. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.00.
- Lụa, Đ. T., Hà, L. T. N., & Hải, N. T. (2015). Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(7), 1101-1108. <https://vjol.info.vn/index.php/hvnn/article/download/31567/26800/>.
- Mahmud, Z. A., Bachar, S. C., Hasan, C. M., Emran, T. B., Qais, N., & Uddin, M. M. N. (2017). Phytochemical investigations and antioxidant

- potential of roots of *Leea macrophylla* (Roxb.). *BMC research notes*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2503-2>.
- Mitsuwan, W., Wintachai, P., & Voravuthikunchai, S. P. (2020). *Rhodomyrtus tomentosa* Leaf Extract and rhodomyrtone combat *Streptococcus pneumoniae* biofilm and inhibit invasiveness to human lung epithelial and enhance pneumococcal phagocytosis by macrophage. *Curr Microbiol*, 77, 3546-3554. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02164-3>.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS●+ assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>.
- Ninon, G. E. R. E., Jelili, A. B., Tesfaye, T. W., Jeanine, L. M., Christopher, N. C., Ahmed, A. H., & Emmanuel, I. I. (2019). Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of novel abietane diterpenes from *Salvia africana-lutea*. *Antioxidants*, 8(10), 421-433. DOI: 10.3390/antiox8100421.
- Nittaya, N., Orawan, M., Yaowared, C., Chantana, B., Charinya, K., Juthamart, M., Pakakrong, K., Supaporn P., & Supawadee, D. (2021). Optimized extraction method for kleeb bua daeng formula with the aid of the experimental design. *Journal of Chemistry*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2021/1457729>.
- Padma, R., Parvathy, N., Renjith, V., Kalpana, P. R., & Rahate, P. (2013). Quantitative estimation of tannins, phenols, and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *Int J Res Pharm Sci*, 4(1), 73-77. <http://scopeindex.org/handle/sc/357>.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341. DOI: 10.1006/abio.1999.4019.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, C., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 1(2), 42-47. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1074429>.
- Thiyagarajan, S., Ramakrishnan, B., Mohan, A., Suryanarayanan, T., Sri, D., & Vellalore, M. B. (2013). Simultaneous extraction optimization and analysis of flavonoids from the flowers of *Tabernaemontana heyneana* by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electron spray ionization/mass spectrometry. *International Scholarly Research Notices*, 1-10. <https://doi.org/10.5402/2013/450948>.
- Xiaoa, W., Han, L., & Shib, B. (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614-618. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03>.
- Yến, H. T., Linh, T. T. T., Thành, M. C., Huyền, N. T. T., Hà, L. T. N., & Ngọc, B. V. (2015). Tối ưu hóa điều kiện tách chiết các hợp chất polyphenol có tính chống oxi hóa cao từ cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk.) thu thập ở vùng đồi núi Chí Linh, Hải Dương. *Tạp chí Sinh học*, 37(4), 509-519. DOI: 10.15625/0866-7160/v37n4.7087