



DOI:10.22144/ctujos.2024.295

## TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH LY TRÍCH CAO CHIẾT HOÀN NGỌC ĐỎ (*Strobilanthes schomburgkii*) THEO HƯỚNG KHÁNG VIÊM

Võ Thành Khang<sup>1</sup>, Nguyễn Quốc Châu Thanh<sup>1\*</sup>, Tạ Thanh Hồng<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Khiêm<sup>1</sup> và  
Đặng Huỳnh Giao<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Trường Bách Khoa, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): [nqcthanh@ctu.edu.vn](mailto:nqcthanh@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 23/10/2023

Sửa bài (Revised): 12/11/2023

Duyệt đăng (Accepted): 16/06/2024

**Title:** Optimization of the extraction process of *Strobilanthes schomburgkii* extract towards anti-inflammatory activity

**Author(s):** Vo Thanh Khang, Nguyen Quoc Chau Thanh\*, Ta Thanh Hong, Nguyen Huu Khiem and Dang Huynh Giao

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Phương pháp bề mặt đáp ứng theo mô hình Box-Behnken được áp dụng để tìm ra các điều kiện tối ưu cho quy trình ly trích cao chiết Hoàn ngọc đỏ có hoạt tính kháng viêm. Các yếu tố được đánh giá dựa vào hoạt động trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO<sup>\*</sup>), một tín hiệu liên quan đến các hoạt động tiền viêm. Kết quả cho thấy quy trình ly trích cao chiết Hoàn ngọc đỏ có sự hỗ trợ của sóng siêu âm được tối ưu với ethyl acetate sau 3 lần chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu ở mức 21,25 mL/g trong 15,99 phút, tại nhiệt độ 52,69°C. Với các điều kiện ly trích trên, cao chiết thu được có giá trị thực nghiệm IC<sub>50</sub> là 226,18 µg/mL, phù hợp với giá trị IC<sub>50</sub> được dự đoán từ mô hình là 227,93 µg/mL.

**Từ khóa:** Box-Behnken, Hoàn ngọc đỏ, kháng viêm, ly trích, tối ưu hóa

### ABSTRACT

Response surface methodology (RSM) according to the Box-Behnken design was applied to find the optimal conditions for the extraction process of *Strobilanthes schomburgkii* extract with anti-inflammatory activity. The factors were evaluated based on their activity with nitric oxide (NO<sup>\*</sup>) radical-scavenging, a signal associated with pro-inflammatory factors. The results showed that the ultrasound-assisted extraction process of Hoan Ngọc red extract was optimized with ethyl acetate after three times extraction, with the solvent-to-material ratio at 21.25 mL/g for 15.99 minutes at 52.69°C. Regarding the above extraction conditions, the obtained extract has an experimental IC<sub>50</sub> value of 226.18 µg/mL, consistent with the IC<sub>50</sub> value predicted from the RSM model of 227.93 µg/mL.

**Keywords:** Anti-inflammatory, Box-Behnken, extraction, optimization, *Strobilanthes schomburgkii*

## 1. GIỚI THIỆU

Viêm được kiểm soát bởi sự hiện diện của một nhóm chất trung gian hóa học, mỗi chất có một vai trò cụ thể ở một số giai đoạn xác định của phản ứng viêm. Các chất trung gian này có thể là ngoại sinh, do vi khuẩn xâm nhập hoặc các chất kích ứng hóa học, hoặc có nguồn gốc nội sinh. Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây chỉ ra vai trò thiết yếu của NO<sup>•</sup>, là một tín hiệu quan trọng trong quá trình hoạt hóa các cytokine tiền viêm, liên quan đến cơ chế bệnh sinh của quá trình viêm (Sharma et al., 2007; Zamora et al., 2000; Bath et al., 2021). Ở điều kiện sinh lý bình thường, NO<sup>•</sup> giữ vai trò điều hòa các tác nhân gây viêm, giãn mạch trong hệ tuần hoàn máu, là một chất dẫn truyền thần kinh tham gia vào các hoạt động của hệ thần kinh. Mặt khác, sự mất cân bằng nội sinh do quá trình sản sinh quá mức của NO<sup>•</sup> được xem là chất trung gian dẫn đến quá trình viêm (Sharma et al., 2007). Bên cạnh đó, NO<sup>•</sup> còn có mối liên quan mật thiết đến các cơ chế bệnh sinh của ung thư, đột quy, thoái hóa thần kinh và một số bệnh lý nguy hiểm khác (Visavadiya et al., 2012). Do đó, việc đánh giá khả năng ức chế đối với NO<sup>•</sup> hoặc các gốc tự do khác ở dạng nội sinh cho thấy tiềm năng thử nghiệm của các hợp chất đối với quá trình kích thích hệ miễn dịch đáp ứng, ức chế với các yếu tố trung gian trong quá trình viêm cũng như các bệnh có liên quan. Hoàn ngọc đỏ (*Strobilanthes schomburgkii*) được dùng như một bài thuốc dân gian hỗ trợ điều trị nhiều bệnh khác nhau, đặc biệt là các bệnh lý có liên quan đến viêm. Các tài liệu khoa học liên quan đến thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm của Hoàn ngọc đỏ còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu tập trung đánh giá khả năng kháng viêm tiềm năng của loài cây này. Tuy nhiên, thành phần các hoạt chất kháng viêm lại chịu ảnh hưởng nhiều bởi nguồn nguyên liệu, phương pháp và điều kiện ly trích. Việc xác định điều kiện ly trích, tối ưu hóa hàm lượng các hoạt chất kháng viêm góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng dược liệu đúng mục đích, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo. Qua đó, các điều kiện chính ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ly trích bao gồm: số lần chiết, dung môi, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu. Vì vậy, một kỹ thuật được áp dụng để khảo sát các yếu tố đơn ảnh hưởng đến quá trình ly trích được sử dụng phổ biến là phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology, RSM). Phương pháp được mô hình hóa quá trình từ các biến độc lập ảnh hưởng trực tiếp đã được xử lý thống kê, xây dựng hoàn chỉnh các điều kiện tối ưu cho quá trình ly trích (Sarfarazi et al., 2015). Trong đó, Box-Behnken là một trong những mô hình được sử dụng phổ biến bởi tính hiệu

quả, thường được áp dụng cho các quy trình ly trích các nhóm hợp chất từ thực vật (Sheng et al., 2013).

Chính vì vậy, một quy trình tối ưu hóa các điều kiện ly trích cao chiết chứa các hợp chất kháng viêm từ Hoàn ngọc đỏ bằng kỹ thuật chiết kết hợp sóng siêu âm, sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) theo mô hình Box-Behnken được đề xuất trong nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu bước đầu đánh giá tiềm năng kháng viêm của các hợp chất được ly trích từ cao chiết Hoàn ngọc đỏ, làm cơ sở cho các nghiên cứu theo định hướng kháng viêm tiếp theo.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất và thuốc thử

Hóa chất sử dụng gồm: Dimethyl sulfoxide (Merck, Mỹ), Phosphomolybdic acid (PMA, Sigma Aldrich, Đức); Griess-reagent (FUJIFILM-Wako, Nhật Bản), Sodium nitroprusside (Merck, Mỹ), Sodium nitrite (Xilong, Trung Quốc). Dung môi hữu cơ gồm: *n*-hexan (Hex), ethyl acetate (EA), methanol (Me), ethanol (Chemsol, Việt Nam).

### 2.2. Nguyên liệu

Hoàn ngọc đỏ được thu hái tại xã Đông Hòa, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang, Việt Nam. Mẫu được định danh và lưu trữ tại Bộ

môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Nguyên liệu tươi được xử lý, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 55°C. Sau khi sấy khô, nguyên liệu khô được nghiền nhuyễn và bảo quản ở nhiệt độ dưới 4°C. Độ ẩm dược liệu được xác định với kết quả là 5,28% ± 0,52 theo hướng dẫn của Dược điển V (Bộ Y tế, 2017).

### 2.3. Hoạt động trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO<sup>•</sup>)

Hỗn hợp phản ứng theo tỷ lệ 1:1 bao gồm cao chiết Hoàn ngọc đỏ với các nồng độ khác nhau và sodium nitroprusside 5 mM. Hỗn hợp trên được ủ dưới ánh sáng trong 30 phút. Lượng NO<sup>•</sup> sinh ra được xác định dựa trên phức màu bằng thuốc thử Griess. Độ hấp thụ quang được xác định ở bước sóng 540 nm và đường chuẩn được xây dựng dựa trên dãy nồng độ của sodium nitrite. Khả năng trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> được đánh giá bởi giá trị IC<sub>50</sub>, nồng độ cao chiết ức chế 50% gốc tự do NO<sup>•</sup>. Các kết quả so sánh với curcumin, một đối chứng dương (Mahmud et al., 2017; Das et al., 2019).

**2.4. Thiết kế thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken**

**2.4.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến quá trình ly trích các hợp chất kháng viêm của cao chiết Hoàn ngọc đỏ**

Bột Hoàn ngọc đỏ được ly trích với nhiều loại dung môi khác nhau (*n*-hexan, ethyl acetate, methanol, ethanol). Ở mỗi nghiệm thức sẽ đồng nhất về tất cả các yếu tố ly trích. Đánh giá dựa trên khả năng kháng viêm của cao chiết thông qua phương pháp trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO<sup>•</sup>) ở mục 2.3.

**2.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của số lần ly trích đến hoạt tính kháng viêm của cao chiết Hoàn ngọc đỏ**

Bột Hoàn ngọc đỏ được ly trích với dung môi phù hợp nhất. Số lần ly trích ở mỗi nghiệm thức được thay đổi nhưng vẫn cố định các yếu tố khác. Việc đánh giá thông qua kết quả sắc ký lớp mỏng hiện hình bằng thuốc thử PMA (phosphomolybdic acid).

**2.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn và thiết kế mô hình Box-Behnken**

Nguyên liệu được ly trích và kết hợp sóng siêu âm, tần số 40 kHz (Elmasonic S100H, Elma, Đức). Dung môi và số lần chiết được sử dụng dựa trên kết quả tối ưu nhất ở các khảo sát ảnh hưởng của dung môi và số lần chiết. Các yếu tố đơn ảnh hưởng được khảo sát lần lượt: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, thời gian và nhiệt độ chiết xuất lần lượt được thay đổi để tìm ra điều kiện tối ưu nhất trong từng yếu tố. Dịch chiết được lọc, cô đặc dưới áp suất 150-200 mbar tại 50°C, bằng hệ thống cô quay chân không Buchi R300 và đông khô bằng máy đông khô Fistek, model: BFD4.5/-50. Cao chiết trên được đánh giá hoạt tính kháng viêm dựa trên hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup>.

Các điều kiện cụ thể được mã hóa đưa vào phần mềm Design Expert 12.0. Các điểm trung tâm được lựa chọn dựa trên các kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn. Đánh giá dựa trên giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> (Thanh và ctv., 2020; Zulkifli et al., 2020; Anh và ctv., 2022).

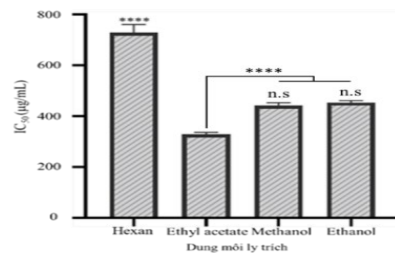
**2.5. Xử lý và phân tích dữ liệu**

Các thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý phân tích thống kê bằng phương pháp ANOVA trên phần mềm GraphPad Prism 8.0.1.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi ly trích đến hoạt tính kháng viêm của cao chiết Hoàn ngọc đỏ**

Dung môi là một trong các điều kiện tiên quyết ảnh hưởng đến quá trình ly trích và hoạt tính của cao chiết. Khảo sát 4 loại dung môi ly trích khác nhau dựa trên sự khác biệt về độ phân cực cho thấy hoạt tính cao nhất được ghi nhận ở dung môi ethyl acetate (độ phân cực: 4,4; hằng số điện môi: 6,0) và thấp nhất ở dung môi hexane (độ phân cực: 0; hằng số điện môi: 1,89). Trong khi đó, cao chiết được ly trích bằng ethanol và methanol có độ phân cực cao (lần lượt độ phân cực: 4,3 và 5,1; hằng số điện môi: 24,3 và 32,4), chứa nhiều hợp chất phenolic, saponin phân cực khác nhau (Tặng và ctv., 2020). Tuy nhiên, kết quả cho thấy hoạt tính đối với hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> thấp hơn so với ethyl acetate (Hình 1). Do đó, hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> ở cao chiết ethyl acetate tốt hơn ở methanol và ethanol có thể được giải thích do sự hiện diện của các hợp chất flavonoid thể hiện hoạt tính, đồng thời số lượng lớn các hợp chất được ly trích có hoạt tính và không có hoạt tính đối với methanol hay ethanol ảnh hưởng đến nồng độ thử nghiệm (Widyawati et al., 2014). Mặt khác, sự chọn lọc các hợp chất có hoạt tính theo độ phân cực giảm dần được thể hiện ở kết quả khảo sát đối với dung môi ethyl acetate và hexane. Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây về hoạt động bắt gốc tự do NO<sup>•</sup> cho thấy hoạt tính tốt nhất được ghi nhận với dung môi chiết là ethyl acetate so với các dung môi phân cực khác, đặc biệt là methanol (Nazir et al., 2018). Vì vậy, ethyl acetate là dung môi phù hợp nhất cho quá trình ly trích cao chiết theo hướng kháng viêm.



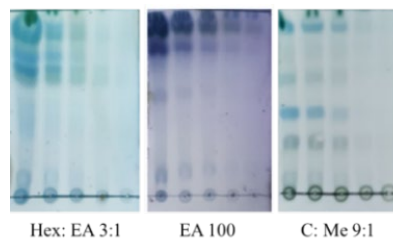
**Hình 1. Ảnh hưởng của dung môi ly trích đến hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> của cao chiết Hoàn ngọc đỏ**

*Ghi chú: Các yếu tố ly trích cố định bao gồm: khối lượng nguyên liệu là 10 g, số lần ly trích là 1 lần, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 10:1 mL/g tại nhiệt độ là 30°C, thời gian là 15 phút. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n = 3), các dấu “\*” thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (\*\*\*\*, p<0,001), n.s.: không khác biệt.*

### 3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của số lần ly trích đến hoạt tính kháng viêm của cao chiết Hoàn ngọc đỏ

Số lần ly trích là một trong những yếu tố cần khảo sát nhằm tối ưu hóa quy trình ly trích, giảm thiểu thời gian và chi phí tiêu hao của dung môi. Số lần ly trích được đánh giá dựa trên số lượng cao chiết thu được ở các lần ly trích độc lập. Mặt khác, kết quả TLC cũng được khảo sát dựa trên độ đậm, nhạt của các vết tương ứng với hàm lượng các hợp chất chính xuất hiện trong cao chiết ở các hệ dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy khối lượng cao chiết thu được nhiều nhất ở lần ly trích thứ nhất là 78,2 mg, so với các lần ly trích tiếp theo với khối lượng giảm dần (Bảng 1). Tại lần ly trích thứ 4 và 5, khối lượng cao chiết khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Mặt khác, kết quả TLC chỉ ra sự khác biệt về hàm lượng các hợp chất sau mỗi lần ly trích (Hình 2). Điều này giải thích cho sự giảm dần tương ứng của

khối lượng cao chiết thu được. Bên cạnh đó, kết quả phân tích TLC cũng thể hiện trực quan về sự hiện diện của các nhóm hợp chất khác nhau và hàm lượng của chúng sau mỗi lần ly trích (Thanh và ctv., 2022). Do đó, 3 lần ly trích được chọn để khảo sát các yếu tố tiếp theo nhưng vẫn đảm bảo hiệu suất ly trích và tiết kiệm dung môi.



Hình 2. Ảnh hưởng của số lần ly trích đến hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> của cao chiết Hoàn ngọc đỏ

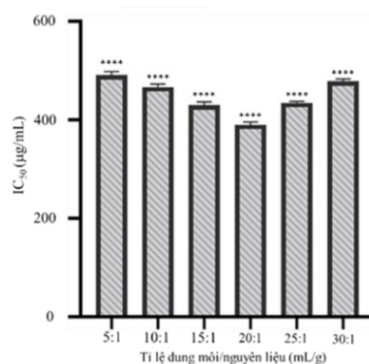
Bảng 1. Khối lượng của cao chiết Hoàn ngọc đỏ sau mỗi lần ly trích

Số lần	1	2	3	4	5
Khối lượng (mg)	78,2 <sup>a</sup> ±0,5	33,4 <sup>b</sup> ±0,7	21,8 <sup>c</sup> ±0,4	8,2 <sup>d</sup> ±0,3	7,1 <sup>d</sup> ±0,8

Ghi chú: Các yếu tố ly trích cố định bao gồm: khối lượng nguyên liệu là 10 g, dung môi ly trích là ethyl acetate 100% (v/v), tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 10:1 mL/g tại 30°C, thời gian là 15 phút. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n = 3); các chữ cái khác nhau thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%.

### 3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn

Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ly trích cũng như hoạt tính của cao chiết. Cụ thể, kết quả cho thấy giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> giảm dần khi tăng dần tỷ lệ dung môi/nguyên liệu. Tại tỷ lệ 20:1 mL/g cho kết quả hoạt tính là tốt nhất với giá trị IC<sub>50</sub> = 389,56±6,43 µg/mL (Hình 3). Kết quả này có thể giải thích do sự chênh lệch giữa nồng độ chất tan và dung môi trong cùng một khối lượng mẫu nhất định, ảnh hưởng đến quá trình truyền khối theo pha rắn vào pha lỏng để đạt trạng thái cân bằng, từ đó làm tăng hàm lượng các chất được ly trích (Samuagam et al., 2013). Tuy nhiên, khi tăng dần tỷ lệ dung môi/nguyên liệu từ 25:1 đến 30:1, giá trị IC<sub>50</sub> tăng dần, đồng nghĩa với sự giảm dần của hoạt tính. Điều này có thể do sự chênh lệch giữa hàm lượng các hợp chất có hoạt tính mạnh và yếu được ly trích khi tăng dần thể tích của dung môi, dẫn đến giá trị IC<sub>50</sub> tăng. Do đó, 20:1 là tỷ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp cho quá trình khảo sát tiếp theo.

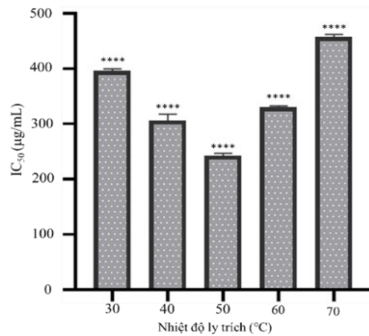


Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> của cao chiết Hoàn ngọc đỏ

Ghi chú: Các yếu tố ly trích cố định bao gồm: khối lượng nguyên liệu là 10 g, dung môi ly trích là ethyl acetate 100% (v/v), nhiệt độ là 30°C, 3 lần ly trích, thời gian là 15 phút. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n = 3), các dấu "\*" thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (\*\*\*\*, p<0,001).

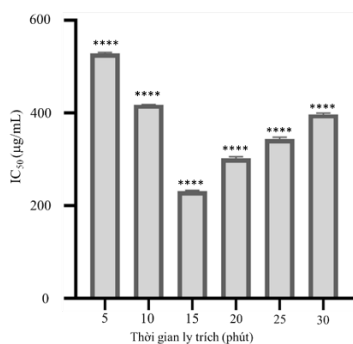
Nhiệt độ ly trích ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của cao chiết Hoàn ngọc đỏ do làm tăng khả năng khuếch tán, sự chuyển động va chạm của các phân tử trong dung môi và khả năng hòa tan của các hợp chất khi nhiệt độ tăng dần với sự hỗ trợ của sóng

siêu âm. Đồng thời nhiệt độ cũng thúc đẩy sự phá vỡ màng tế bào, tăng cường khả năng thâm thấu của dung môi. Cụ thể, khi tăng nhiệt độ từ 30°C đến 50°C, hoạt tính tăng dần tương ứng với giá trị IC<sub>50</sub> giảm dần (Hình 4). Giá trị IC<sub>50</sub> thấp nhất tại nhiệt độ 50°C (IC<sub>50</sub> = 242,75±4,00 µg/mL). Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng đến 60°C và 70°C, hoạt tính giảm dần tương ứng với giá trị IC<sub>50</sub> tăng dần, điều này được giải thích do sự phân hủy của các hợp chất có hoạt tính ở nhiệt độ cao (Silva et al., 2007). Vì vậy, nhiệt độ 50°C được chọn để khảo sát các yếu tố tiếp theo.



**Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ ly trích đến hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> của cao chiết Hoan ngọc đỏ**

Ghi chú: Các yếu tố ly trích cố định bao gồm: khối lượng nguyên liệu là 10 g, dung môi ly trích là ethyl acetate 100% (v/v), 3 lần ly trích, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 20:1 mL/g, thời gian là 15 phút. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n = 3), các dấu “\*” thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (\*\*\*\*, p<0,001).



**Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian ly trích đến hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> của cao chiết Hoan ngọc đỏ**

Ghi chú: Các yếu tố ly trích cố định bao gồm: khối lượng nguyên liệu là 10 g, dung môi ly trích là ethyl acetate 100% (v/v), 3 lần ly trích, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 20:1 mL/g tại 50°C. Các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình ± SD (n = 3), các dấu “\*” thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (\*\*\*\*, p<0,001).

Thời gian là một trong những yếu tố quan trọng cần được khảo sát, nhằm tiết kiệm chi phí, đạt hiệu quả tối đa cho quá trình ly trích. Kết quả cho thấy khi tăng thời gian từ 5 phút đến 15 phút, hoạt tính tăng dần với giá trị IC<sub>50</sub> tốt nhất đạt 231,13±2,26 µg/mL (Hình 5). Thời gian tăng, quá trình truyền khối diễn ra giữa hai pha rắn và lỏng dựa trên sự khuếch tán để đạt trạng thái cân bằng (Thanh và ctv., 2022). Phần lớn các hợp chất có hoạt tính được ly trích trong giai đoạn này. Tuy nhiên, khi tăng dần thời gian, hàm lượng các hợp chất tăng lên đã ảnh hưởng đến nồng độ thử nghiệm. Do đó, khi tăng thời gian đến 30 phút, hoạt tính giảm dần. Vì vậy, 15 phút là thời gian tốt nhất cho quá trình khảo sát này.

### 3.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng trên phần mềm Design Expert 12.0 theo mô hình Box-Behnken

Dựa theo các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ly trích các hợp chất có hoạt tính kháng viêm từ Hoàn ngọc đỏ bằng phương pháp ly trích có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, phương pháp bề mặt đáp ứng được thiết kế theo mô hình Box-Behnken với ba biến A, B, C lần lượt tương ứng với các yếu tố như tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ ly trích, thời gian ly trích. Ba biến giá trị xoay quanh điểm trung tâm cố định của các yếu tố đơn được sử dụng để xây dựng quy trình tối ưu hóa. Kết quả IC<sub>50</sub> thực nghiệm dựa trên các nghiệm thức được đề xuất bởi phần mềm Design Expert 12.0 (Bảng 2). Trong đó, giá trị IC<sub>50</sub> thấp nhất và cao nhất lần lượt ở nghiệm thức 14 và 3, lần lượt là 222,14±3,76 (µg/mL) và 340,91±10,79 (µg/mL). Nhận thấy giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> thấp tập trung ở 5 nghiệm thức trung tâm (nghiệm thức 13 - 17) với A: 20 mL/g, B: 50°C, C: 15 phút, khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức còn lại.

Phần mềm Design Expert 12.0 cho kết quả phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình tối ưu hóa (Bảng 3). Sự không phù hợp (Lack of fit= 0,9178) của mô hình dự đoán không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) đồng nghĩa rằng sai số của mô hình không đáng kể. Hệ số tương quan (R<sup>2</sup>= 0,964) của mô hình dự đoán lớn hơn 0,8. Giá trị Lack of fit với p>0,05, R<sup>2</sup>>0,8 chứng tỏ mô hình có tính áp dụng thực tế và ý nghĩa thực nghiệm cao, đồng thời cũng khẳng định mức độ đáng tin cậy của phương trình hồi quy tuyến tính dự đoán giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> (Lai et al., 2014; Tomaz et al., 2016; Cui et al., 2019). Phương trình hồi quy có dạng hàm bậc hai phụ thuộc vào các yếu tố độc lập như tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian chiết; phụ thuộc vào tương tác của hai

yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu với nhiệt độ, giữa nhiệt độ với thời gian chiết và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu với thời gian. Mô hình có giá trị F là 115,85 và

$p < 0,0001$ , điều này khẳng định mô hình có sự tương quan tốt với phân tích phương sai có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 2. Kết quả thực nghiệm dựa trên các nghiệm thức của phần mềm Design Expert 12.0**

Nghiệm thức	Các biến độc lập			IC <sub>50</sub> dự đoán	IC <sub>50</sub> thực tế
	A (mL/g)	B (°C)	C (phút)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	15	40	15	292,24	294,75 <sup>a</sup> ±6,28
2	25	40	15	332,72	337,81 <sup>b</sup> ±7,17
3	15	60	15	348,34	340,91 <sup>bc</sup> ±10,79
4	25	60	15	252,42	247,42 <sup>d</sup> ±4,76
5	15	50	10	338,54	338,54 <sup>bce</sup> ±4,03
6	25	50	10	269,67	266,47 <sup>df</sup> ±4,67
7	15	50	20	279,03	279,87 <sup>afg</sup> ±4,62
8	25	50	20	292,46	290,14 <sup>agh</sup> ±7,28
9	20	40	10	286,56	281,37 <sup>afghi</sup> ±5,48
10	20	60	10	316,46	319,61 <sup>bcej</sup> ±4,82
11	20	40	20	310,20	304,61 <sup>ahkj</sup> ±1,59
12	20	60	20	256,10	258,91 <sup>dfigl</sup> ±10,50
13	20	50	15	232,63	232,36 <sup>dm</sup> ±5,22
14	20	50	15	232,63	222,14 <sup>mn</sup> ±3,76
15	20	50	15	232,63	228,42 <sup>dmno</sup> ±11,13
16	20	50	15	232,63	229,62 <sup>dmnop</sup> ±9,73
17	20	50	15	232,63	244,75 <sup>lmnopq</sup> ±8,61

Ghi chú: A: Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g), B: Nhiệt độ (°C), C: Thời gian (phút). Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%

Phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm của phần mềm Design Expert 12.0 đề xuất với 17 nghiệm thức (mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần độc lập với nhau) xoay quanh mô hình Box-Behnken) cho kết quả mô hình đa thức bậc hai dự đoán giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> dựa trên mối quan hệ của các yếu tố khảo sát như sau:

$$IC_{50} = 1313,85872 - 42,13663A - 16,26484B - 26,21554C - 0,682688AB + 0,823353AC - 0,419660BC + 1,52788A^2 + 0,355674B^2 + 0,963991C^2$$

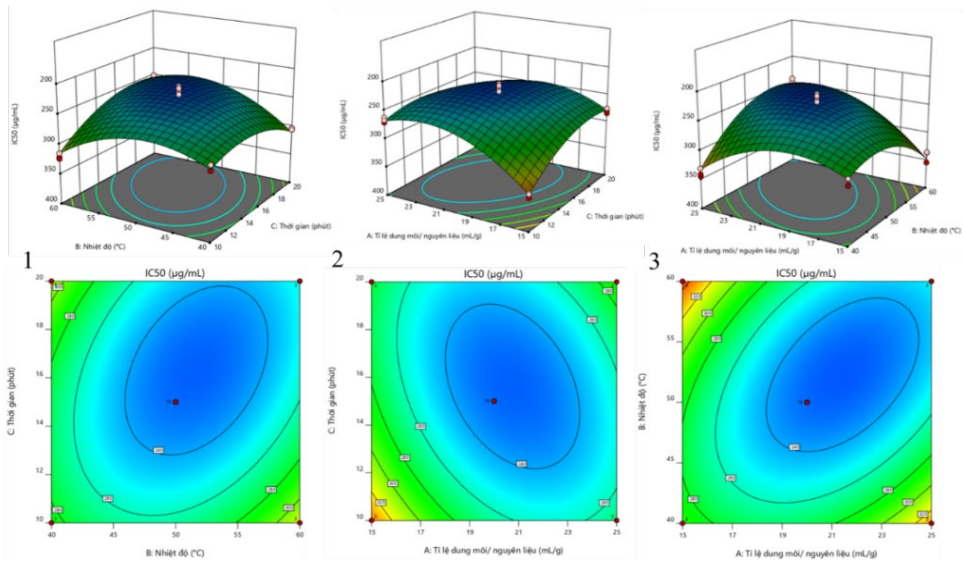
Biểu đồ bề mặt phản ứng của mô hình khảo sát tương tác của hai biến khác nhau, trong phạm vi thực

**Bảng 3. Phân tích ANOVA của các yếu tố dựa trên kết quả thực nghiệm**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Block	138,23	2	69,11			
Model	78462,33	9	8718,04	115,85	< 0,0001	significant
A- Tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu	4722,73	1	4722,73	62,76	< 0,0001	
B- Nhiệt độ	1001,86	1	1001,86	13,31	0,0008	
C-Thời gian	1969,40	1	1969,40	26,17	0,0015	

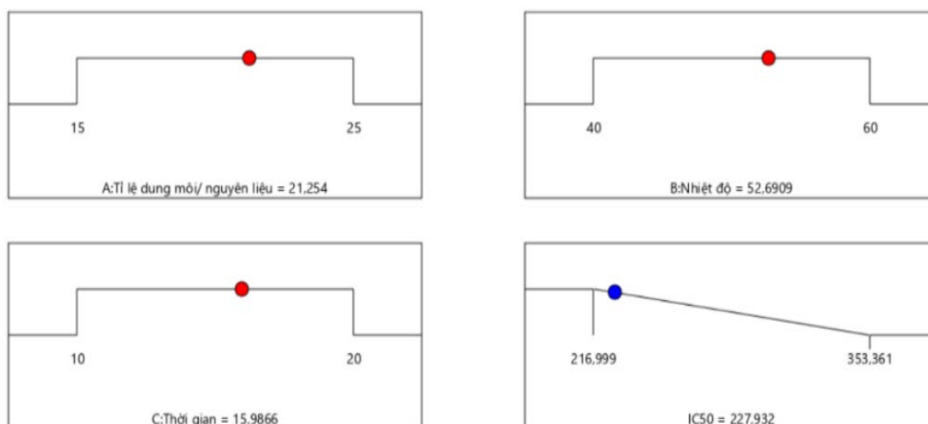
thực nghiệm xung quanh giá trị trung tâm được xác định ở các nghiệm thức đơn, giữ cố định biến còn lại ở giá trị trung tâm của nó. Những tương tác của các yếu tố đơn lẻ với nhau phản ánh rõ hơn những ảnh hưởng của chúng đến khả năng kháng viêm của cao chiết Hoàn ngọc đỏ. Hình 6 là mô hình tương tác giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian, giá trị IC<sub>50</sub> của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> đạt cực tiểu khi các giá trị tỷ lệ dung môi/nguyên liệu trong khoảng 19-21 mL/g, thời gian chiết khoảng 15 phút. Biểu hiện tương tự cũng xuất hiện ở hai biểu đồ còn lại khi các yếu tố đơn đạt đến khoảng giá trị trung tâm.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
AB	13981,88	1	13981,88	185,80	< 0,0001
AC	5084,33	1	5084,33	67,56	< 0,0001
BC	5283,43	1	5283,43	70,21	< 0,0001
A <sup>2</sup>	18429,58	1	18429,58	244,90	< 0,0001
B <sup>2</sup>	15979,45	1	15979,45	212,34	< 0,0001
C <sup>2</sup>	7336,42	1	7336,42	97,49	< 0,0001
Residual	2934,84	39	75,25		
Lack of Fit	1593,69	27	59,03	0,5281	0,9178 not significant
Pure Error	1341,15	12	111,76		
Cor Total	81535,40	50	<b>R<sup>2</sup>=0,964</b>	<b>R<sup>2</sup> Adj =0,956</b>	<b>R<sup>2</sup> Pre = 0,942</b>



**Hình 6. Bề mặt đáp ứng của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>7</sup> của cao chiết Hoàn ngọc đỏ**

Ghi chú: 1: Mô hình tương tác giữa yếu tố nhiệt độ và yếu tố thời gian; 2: Mô hình tương tác giữa yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và yếu tố thời gian; 3: Mô hình tương tác giữa yếu tố nhiệt độ và yếu tố tỷ lệ dung môi/nguyên liệu



**Hình 7. Hàm kỳ vọng và điều kiện lý trích tối ưu các hợp chất kháng viêm từ Hoàn ngọc đỏ**

Dựa trên các kết quả phân tích trên, phương án tốt nhất để chiết xuất cao chiết có hoạt tính kháng viêm tối ưu nhất từ Hoàn ngọc đỏ được phân mềm

Design Expert 12.0 đề xuất là A: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu = 21,25 mL/g, B: nhiệt độ= 52,69°C, C: thời gian= 15,99 phút, với giá trị IC<sub>50</sub>

của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> được dự đoán là 227,93 µg/mL; trong khi đó kết quả thực nghiệm là 226,18 ± 5,58 µg/mL (không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%) (Hình 7). Mặt khác, với phương pháp ngâm dâm, một phương pháp thường quy được sử dụng ly trích được liệu, nghiên cứu đã đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng viêm dựa trên hoạt động bắt gốc tự do NO<sup>•</sup> của các loại cao chiết methanol Hoàn ngọc đỏ (IC<sub>50</sub>=440,72±12,09 µg/mL), cao ethanol Hoàn ngọc đỏ (IC<sub>50</sub>=452,94±4,04 µg/mL), cao ethyl acetate Hoàn ngọc đỏ (IC<sub>50</sub>=328,46±7,99 µg/mL). Kết quả này cho thấy, hoạt tính của cao chiết được tối ưu với quy trình thực nghiệm sử dụng phương pháp ly trích có hỗ trợ sóng siêu âm có hoạt tính tốt hơn. Vì vậy, quy trình được xây dựng thích hợp ứng

dụng với quy mô công nghiệp nhằm tiết kiệm chi phí, thời gian và đem lại hiệu quả cao.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã đánh giá được ảnh hưởng của dung môi ly trích, số lần ly trích, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian dựa trên hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> nhằm tối ưu quá trình ly trích cao chiết Hoàn ngọc đỏ có khả năng kháng viêm bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Các yếu tố tối ưu được xác định: dung môi ly trích là ethyl acetate, số lần ly trích là 3 lần, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 21,25 mL/g, thời gian chiết 15,99 phút, nhiệt độ chiết 52,69°C với giá trị IC<sub>50</sub> đạt được của hoạt động trung hòa gốc tự do NO<sup>•</sup> là 226,18 ± 5,58 µg/mL.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anh, V. T. T., Linh, T. C., Kha, Đ. M., & Trang, Đ. T. X. (2022). Tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao chiết giàu polyphenol và flavonoid có hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. từ lá Cây Núc Nác (*Oroxylum indicum* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 58(2), 102-113. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.126>
- Bộ Y Tế. (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học.
- Bath, P. M., Coleman, C. M., Gordon, A. L., Lim, W. S., & Webb, A. J. (2021). Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections. *F1000Research*, 1-43. <https://doi.org/10.12688/f1000research.51270.1>
- Cui, H., Lu, T., Wang, M., Zou, X., Zhang, Y., Yang, X., Dong, Y., & Zhou, H., (2019). Flavonoids from *Morus alba* L. leaves: Optimization of extraction by response surface methodology and comprehensive evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and inhibition of α-amylase activities through analytical hierarchy process. *Molecules*, 24(13), 2398, 1-16. <https://doi.org/10.3390/molecules24132398>
- Das, G., Patra, J. K., Debnath, T., Ansari, A., & Shin, H. S. (2019). Investigation of antioxidant, antibacterial, antidiabetic, and cytotoxicity potential of silver nanoparticles synthesized using the outer peel extract of *Ananas comosus* (L.). *Plos One*, 14(8), 1-19. <http://doi: 10.1371/journal.pone.0220950>
- Lai, J., Wang, H., Wang, D., Fang, F., Wang, F., & Wu, T. (2014). Ultrasonic extraction of antioxidants from Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit using response surface methodology and their characterization. *Molecules*, 19(7), 9019-9032. <https://doi.org/10.3390/molecules19079019>
- 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, 245. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2503-2>
- Nazir, A. W., & Sharmila, T. (2018). Evaluation of antioxidant properties of different extracts of *Chaetomium cupreum* SS02. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 56(2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2018.08.001>
- Samuagam, L., Sia, C. M., Akowuah, G. A., Okechukwu, P. N., & Yim, H. S. (2013). The effect of extraction conditions on total phenolic content and free radical scavenging capacity of selected tropical fruits' peel. *Health and the Environmental Journal*, 4, 80–102.
- Sarfaraizi, M., Jafari, S. M., & Rajabzadeh, G. (2015). Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 8(9), 2273-2285. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9995-3>
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259. <http://doi: 10.1007/s10787-007-0013-x>
- Sheng, Z. -L., Wan, P. -F., Dong, C. -L., & Li, Y.-H. (2013). Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 778-786. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.020>
- Silva, E. M., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification*



- Technology*, 55, 381– 387.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.01.008>
- Tặng, N. V., Giang, T. T., Trung, H. Q., Trâm, P. T. B., An, P. C., & Hạnh, T. T. M. (2020). Ảnh hưởng của dung môi và phương pháp trích ly đến khả năng chiết tách các hợp chất phenolics, saponins và alkaloids từ vỏ ca cao (*Theobroma cacao* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(2), 71-78.  
<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.084>
- Thanh, N. T., Thang, T. D., Huyen, N. T., & Ha, T. T. T. (2020). Optimization of Total Phenolic and Total Flavonoid extraction conditions from leaves of *Launaea sarmentosa* using the Response Surface Methodology. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 25(2), 214-220.
- Thanh, N. Q. C., Thao, N. T. T., Vinh, N. T., & Luân, N. T. (2022). Nghiên cứu quy trình chiết tách cao chiết lá Ngũ sắc (*Lantana camara* L.) và đánh giá hiệu lực phòng trừ sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrosis medinalis*). *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 445(2), 36-44.
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D. & Kontić J. K. (2016). Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. *Phytochemical Analysis*, 27(1), 13-22.  
<http://doi.org/10.1002/pca.2582>
- Visavadiya, N. P., McEwen, M. L., Pandya, Patrick, J. D., Sullivan, G., Gwag, B. J., & Springer, J. E. (2012). Antioxidant properties of Neu2000 on mitochondrial free radicals and oxidative damage. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 788-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.011>
- Widyawati, P. S., Dwi, T., Budianta, W., & Kusuma, F. A. (2014). Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indicia* Less leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6, 850–855.
- Zamora, R., Vodovotz, Y., & Billiar, T. R. (2000). Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases. *Molecular Medicine*, 6,347–373.  
<https://doi.org/10.1007/BF03401781>
- Zulkifli, S. A., Gani, S. S. A., Zaidan, U. H., & Halmi, M. I. E. (2020). Optimization of Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Defatted Pitaya (Hylocereus polyrhizus)* Seed Extract and Its Antioxidant Properties. *Molecules*, 25(4), 787.  
<http://doi.org/10.3390/molecules25040787>