



DOI:10.22144/ctujos.2026.189

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TRÍCH LY POLYPHENOL TỔNG VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CAO CHIẾT LÁ CÂY DIẾP CÁ (*Houttuynia cordata* Thunb.)

Lê Thị Bạch^{1,*}, Nguyễn Nhã Uyên¹ và Trần Trung Hưng¹, Phạm Quốc Nhiên¹ và Phạm Thị Kim Phụng²

¹Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ltbach@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 02/06/2026

Sửa bài (Revised): 02/07/2026

Duyệt đăng (Accepted): 20/08/2026

Title: Optimization of extraction conditions for total polyphenol content and evaluation of antioxidant activity from *Houttuynia cordata* Thunb. leaves

Author(s): Le Thi Bach^{1,*}, Nguyen Nha Uyen¹, Tran Trung Hung¹, Pham Quoc Nien¹ and Pham Thi Kim Phung²

Affiliation(s): ¹College of Natural Sciences, Can Tho University, Viet Nam; ²An Giang University, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu tập trung tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol tổng từ lá diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.) và đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết thu được. Các thông số ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly được khảo sát và tối ưu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology, RSM) kết hợp với thiết kế Box-Behnken. Điều kiện trích ly tối ưu được xác định là ethanol 89,66%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 53,50 mL/g, nhiệt độ 54,62°C và thời gian 4,39 giờ. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) dự đoán đạt 119,807 mg GAE/g cao chiết, trong khi giá trị thực nghiệm đạt $118,373 \pm 0,250$ mg GAE/g cao chiết. Cao chiết tối ưu có hoạt tính kháng oxy hóa với giá trị IC_{50} theo phương pháp DPPH và ABTS⁺ lần lượt là $113,73 \pm 0,37$ và $21,39 \pm 0,11$ µg/mL. Kết quả khẳng định độ tin cậy của mô hình tối ưu và tiềm năng ứng dụng trong khai thác polyphenol từ lá diếp cá.

Từ khóa: Diếp cá, kháng oxy hóa, polyphenol, tối ưu hóa

ABSTRACT

Optimization of total polyphenol extraction from *Houttuynia cordata* Thunb. leaves was carried out using response surface methodology (RSM) based on a Box-Behnken design, followed by evaluation of the antioxidant activity of the obtained extract. The optimal extraction conditions were 89.66% ethanol, a solvent-to-material ratio of 53.50 mL/g, a temperature of 54.62°C, and an extraction time of 4.39 h. The predicted total polyphenol content (TPC) was 119.807 mg GAE/g extract, while experimental validation yielded 118.373 ± 0.250 mg GAE/g extract. The optimized extract exhibited antioxidant activity, with IC_{50} values of 113.73 ± 0.37 µg/mL for the DPPH assay and 21.39 ± 0.11 µg/mL for the ABTS⁺ assay. The close agreement between the predicted and experimental TPC values confirms the reliability of the optimization model and supports its application for efficient polyphenol extraction from *Houttuynia cordata* leaves.

Keywords: Antioxidant, *Houttuynia cordata* Thunb., optimization, polyphenol

1. GIỚI THIỆU

Sự mất cân bằng giữa quá trình hình thành các loại oxy phản ứng và hệ thống kháng oxy hóa nội sinh được xem là nguyên nhân chính dẫn đến stress oxy hóa. Tình trạng này dẫn đến tổn thương màng tế bào, biến tính protein và rối loạn vật chất di truyền, góp phần thúc đẩy lão hóa và nhiều bệnh mạn tính. Do đó, polyphenol có nguồn gốc thực vật ngày càng được quan tâm nhờ khả năng kháng oxy hóa mạnh và tiềm năng ứng dụng trong dược phẩm, thực phẩm chức năng và chăm sóc sức khỏe cộng đồng (Jomova et al., 2023; Sikder et al., 2025).

Polyphenol là nhóm chất chuyển hóa thứ cấp phân bố rộng rãi trong thực vật và góp phần tạo nên hoạt tính kháng oxy hóa. Nhờ cấu trúc giàu nhóm hydroxyl phenolic, các hợp chất này có khả năng cho electron hoặc proton để bất hoạt các gốc tự do, qua đó góp phần hạn chế các phản ứng oxy hóa và bảo vệ hệ sinh học khỏi tổn thương do stress oxy hóa gây ra (Rudrapal et al., 2022; Sun et al., 2024). Nhiều công trình nghiên cứu đã ghi nhận rằng polyphenol không chỉ thể hiện khả năng kháng oxy hóa mạnh mà còn sở hữu nhiều hoạt tính sinh học khác như kháng viêm, kháng khuẩn và hỗ trợ làm giảm nguy cơ mắc các bệnh lý mạn tính (Park et al., 2023). Chính vì vậy, việc tìm kiếm và khai thác các nguồn dược liệu giàu polyphenol ngày càng được quan tâm, nhằm phát triển các sản phẩm tự nhiên có giá trị ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm và chăm sóc sức khỏe.

Houttuynia cordata Thunb., thuộc họ Saururaceae, là loài thực vật thân thảo phân bố rộng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, bao gồm Việt Nam. Trong y học dân gian, cây diếp cá từ lâu đã được sử dụng như một vị thuốc có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, tiêu viêm, lợi tiểu và hỗ trợ điều trị nhiều bệnh lý liên quan đến hô hấp, tiêu hóa và da. Kết quả của các nghiên cứu hóa thực vật cho thấy lá của loài cây này chứa nhiều nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học, bao gồm flavonoid, polyphenol, alkaloid và các thành phần tinh dầu. Trong đó, một số flavonoid đặc trưng như quercetin, quercitrin và hyperin được chứng minh có khả năng loại bỏ gốc tự do hiệu quả, góp phần tạo nên hoạt tính kháng oxy hóa của dược liệu. Bên cạnh đó, nhiều báo cáo cũng ghi nhận cao chiết lá cây Diếp cá có các tác dụng sinh học đáng chú ý như kháng khuẩn, kháng viêm, kháng oxy hóa và bảo vệ tế bào, mở ra triển vọng ứng dụng trong phát triển dược phẩm và thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên (Li et al., 2022; Charachit et al., 2022).

Quá trình trích ly polyphenol từ dược liệu chịu tác động của nhiều điều kiện, trong đó nồng độ dung môi, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian là các thông số quan trọng. Việc tối ưu hóa các điều kiện trích ly có vai trò quan trọng trong việc nâng cao hàm lượng polyphenol và hoạt tính sinh học của cao chiết (Dai & Mumper, 2010). Hơn nữa, việc ứng dụng các phương pháp thiết kế thí nghiệm hiện đại, chẳng hạn như Box-Behnken Design (BBD) đã trở thành công cụ hữu hiệu để tối ưu hóa quy trình trích ly theo hướng khoa học và tiết kiệm tài nguyên. BBD không chỉ giúp khảo sát tương tác giữa các biến số một cách toàn diện mà còn rút ngắn số lượng thí nghiệm cần thiết để đạt kết quả tối ưu (Ferreira et al., 2007). Mặc dù việc ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) đã được thực hiện trong một số nghiên cứu để tối ưu hóa quá trình trích ly flavonoid từ lá diếp cá bằng các kỹ thuật như siêu âm (Nguyen et al., 2021; Nguyen et al., 2024) hoặc kết hợp dung môi eutectic sâu (DES) với siêu âm (Wu et al., 2025) nhưng các nghiên cứu này chủ yếu hướng đến thu nhận flavonoid hoặc các hợp chất đặc hiệu. Trong khi đó, các nghiên cứu tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp ngâm dầm sử dụng ethanol và đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết thu được dưới điều kiện tối ưu vẫn còn hạn chế. Do đó, phương pháp RSM theo thiết kế Box-Behnken đã được ứng dụng trong nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa đồng thời các điều kiện trích ly polyphenol tổng và đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết điều chế theo điều kiện tối ưu.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu tập trung tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol tổng từ lá diếp cá bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Bên cạnh đó, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết tối ưu được đánh giá thông qua hai phép thử DPPH và ABTS*. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho việc khai thác hiệu quả nguồn polyphenol từ lá diếp cá, hướng đến các ứng dụng trong dược phẩm và thực phẩm chức năng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Các hóa chất và thuốc thử chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: ethanol (Chemsol, Việt Nam), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Mỹ), gallic acid (Sigma-Aldrich, Mỹ), quercetin (Sigma-Aldrich, Mỹ), DPPH và ABTS (Sigma-Aldrich, Mỹ).

2.2. Thu hái và xử lý mẫu

Mẫu lá tươi của cây diếp cá (*H. cordata*) được thu thập tại Thành phố Cần Thơ vào tháng 10 năm

2025. Việc định danh mẫu diệp cá được thực hiện bởi TS. Nguyễn Thị Kim Huê, Khoa Sinh học, Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ. Sau khi thu hái, nguyên liệu được rửa sạch, làm khô bằng phương pháp sấy đối lưu ở 50°C trong 48 giờ (hãng Memmert, Đức), sau đó được nghiền mịn và bảo quản trong điều kiện lạnh (nhiệt độ dưới 4°C) để hạn chế sự phân hủy hoạt chất. Độ ẩm của dược liệu được xác định theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo quy định của Dược điển Việt Nam V (Bộ Y tế, 2017). Kết quả cho thấy độ ẩm của mẫu là $9,89 \pm 0,09\%$.

2.3. Định lượng polyphenol toàn phần

Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteu, tham khảo Chandra et al. (2014) và Ainsworth and Gillespie (2007). Mẫu chiết hoặc dung dịch chuẩn gallic acid (200 µL) được phối trộn với 200 µL nước cất và 200 µL thuốc thử Folin-Ciocalteu. Sau khi phản ứng trong 5 phút, bổ sung 200 µL dung dịch Na_2CO_3 10% và tiếp tục ủ ở 40°C trong 30 phút. Độ hấp thụ được ghi nhận tại bước sóng 765 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Hàm lượng polyphenol tổng được xác định từ đường chuẩn gallic acid và biểu thị dưới dạng mg GAE/g cao chiết.

2.4. Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được xác định bằng phép thử DPPH theo phương pháp của Hussien and Endalew (2023). Dung dịch mẫu ở các nồng độ khảo sát được trộn với dung dịch DPPH (40 µL, 1000 µg/mL) theo tỷ lệ 960:40 (v/v). Sau khi ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo tại bước sóng 517 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Vitamin C (ascorbic acid) được sử dụng làm đối chứng dương. Hoạt tính kháng oxy hóa được biểu thị bằng giá trị IC_{50} , tương ứng với nồng độ mẫu cần thiết để loại bỏ 50% gốc tự do DPPH.

2.5. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS⁺

Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được xác định bằng phép thử ABTS theo Re et al. (1999) và Thaipong et al. (2006). Gốc tự do ABTS⁺ được tạo thành từ phản ứng giữa dung dịch ABTS 7 mM và $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,45 mM, sau đó ủ trong tối từ 12-16 giờ. Trước khi tiến hành thí nghiệm, dung dịch ABTS⁺ được pha loãng đến độ hấp thụ $0,70 \pm 0,02$ tại 734 nm. Tiếp theo, 100 µL mẫu chiết được bổ sung vào 1 mL dung dịch ABTS⁺ và phản ứng trong 6 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ được ghi nhận tại bước sóng 734 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Trolox

được sử dụng làm đối chứng dương. Hoạt tính kháng oxy hóa được biểu thị bằng giá trị IC_{50} , tương ứng với nồng độ mẫu cần thiết để loại bỏ 50% gốc tự do ABTS⁺.

2.1. Đánh giá tác động của các yếu tố đơn

Đối với mỗi nghiệm thức, cao chiết lá diệp cá được điều chế từ 1 g bột dược liệu bằng phương pháp ngâm dầm với ethanol. Các thí nghiệm được thực hiện độc lập và lặp lại ba lần. Trước khi xây dựng mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) theo thiết kế Box-Behnken, từng thông số trích ly gồm nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian được khảo sát riêng để lựa chọn khoảng giá trị phù hợp. Dịch chiết sau khi lọc được cô đặc dưới áp suất giảm ở 50°C bằng thiết bị cô quay chân không để thu nhận cao chiết. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) được lựa chọn làm biến đáp ứng để đánh giá ảnh hưởng của các thông số trích ly và xây dựng mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Sau khi xác định điều kiện trích ly tối ưu, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết thu được được đánh giá bằng các phép thử trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS⁺.

Hiệu suất thu hồi cao chiết (%) = $\left(\frac{\text{Khối lượng cao chiết thu được}}{\text{Khối lượng dược liệu ban đầu}} \right) \times 100\%$

2.6. Thiết kế thực nghiệm Box-Behnken

Các biến thí nghiệm được mã hóa và phân tích bằng phần mềm Design-Expert 12.0 theo thiết kế Box-Behnken. Thiết kế Box-Behnken gồm tổng cộng 29 nghiệm thức, trong đó có 24 nghiệm thức tổ hợp và 5 nghiệm thức tại điểm trung tâm nhằm đánh giá độ phù hợp và tính lặp lại của mô hình, dựa trên các kết quả thu được từ khảo sát từng yếu tố riêng lẻ trước đó. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) được sử dụng làm chỉ tiêu đánh giá hiệu quả trích ly và làm biến đáp ứng trong mô hình tối ưu hóa. Sau khi xác định điều kiện tối ưu, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết được đánh giá bằng các phép thử DPPH và ABTS⁺. Mỗi nghiệm thức được tiến hành lặp lại ba lần để tăng độ tin cậy và hạn chế sai số thực nghiệm.

2.7. Phân tích thống kê dữ liệu

Sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm được xác định bằng phép phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA). Các khác biệt có giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê. Phần mềm Design Expert 12.0 được dùng cho RSM-BBD.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tác động của nồng độ dung môi

Hiệu quả trích ly hoạt chất từ thực vật chịu ảnh hưởng đáng kể bởi loại và nồng độ dung môi. Sự thay đổi độ phân cực của dung môi ethanol làm thay đổi khả năng hòa tan các hợp chất mục tiêu, qua đó ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận polyphenol. Trong nghiên cứu này, hàm lượng polyphenol tổng tăng theo nồng độ ethanol và đạt giá trị cao nhất là $114,184 \pm 0,528$ mg GAE/g cao chiết tại nồng độ ethanol 90% (Hình 1A). Điều này cho thấy rằng, trong trường hợp các hợp chất kém phân cực chiếm ưu thế, nồng độ dung môi cao có thể cải thiện đáng kể khả năng hòa tan và giải phóng hoạt chất khỏi ma trận thực vật.

Kết quả thu được phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó nồng độ ethanol được xác định là một trong những yếu tố quan trọng chi phối hiệu suất thu nhận polyphenol từ nguyên liệu thực vật. Theo nghiên cứu của Do et al. (2014), khi khảo sát quá trình trích ly hợp chất phenolic từ *Limnophila aromatica*, hàm lượng polyphenol toàn phần tăng theo nồng độ ethanol và đạt giá trị cao nhất ở khoảng 100% ethanol, với hàm lượng phenolic đạt 40,5 mg GAE/g cao chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự khác biệt về độ phân cực của dung môi chi phối khả năng hòa tan của các hợp chất phenolic, từ đó ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận polyphenol. Ngoài ra, ethanol nồng độ cao còn hỗ trợ phá vỡ liên kết giữa hoạt chất và cấu trúc thành tế bào thực vật, từ đó cải thiện hiệu quả khuếch tán và giải phóng hoạt chất vào dung môi. Trong khi đó, Thoo et al. (2010) ghi nhận nồng độ ethanol tối ưu là 40% đối với quá trình trích ly polyphenol từ quả *Morinda citrifolia*. Sự khác biệt này có thể liên quan đến sự khác nhau về nguồn nguyên liệu thực vật, thành phần hóa học của mẫu nghiên cứu và điều kiện trích ly được sử dụng. Tuy nhiên, cả hai nghiên cứu đều cho thấy nồng độ ethanol là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả thu hồi các hợp chất phenolic. Nhìn chung, việc lựa chọn nồng độ dung môi phù hợp đóng vai trò quyết định trong quá trình tối ưu hóa hiệu suất trích ly polyphenol từ nguyên liệu thực vật (Azmir et al., 2013; Dai & Mumper, 2010; Do et al., 2014; Thoo et al., 2010).

Kết quả khảo sát cho thấy ethanol 90% là điều kiện thích hợp và được sử dụng trong các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

3.2. Tác động của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

Sự thay đổi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu làm thay đổi hiệu quả thu nhận polyphenol từ lá diếp cá (Hình 1B). Giá trị TPC biến động theo từng tỷ lệ khảo sát

và đạt cực đại tại tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 50 mL/g, với hàm lượng $89,302 \pm 0,349$ mg GAE/g cao chiết. Hiện tượng này có thể được lý giải bởi sự gia tăng chênh lệch nồng độ giữa các hợp chất hòa tan trong nền nguyên liệu và dung môi chiết, qua đó thúc đẩy quá trình truyền khối và khuếch tán các hoạt chất từ pha rắn sang pha lỏng cho đến khi hệ đạt trạng thái cân bằng, dẫn đến sự gia tăng hiệu suất trích ly các hợp chất polyphenol (Cacace & Mazza, 2003; Dai & Mumper, 2010). Sau khi đạt giá trị cực đại ở tỷ lệ 50 mL/g, hàm lượng polyphenol tổng giảm khi tỷ lệ dung môi/nguyên liệu được tăng lên 60 mL/g. Điều này có thể liên quan đến sự pha loãng hệ chiết và sự suy giảm động lực truyền khối khi quá trình khuếch tán dần tiến đến trạng thái cân bằng. Những kết quả này cho thấy hiệu suất thu nhận các hợp chất phenolic phụ thuộc đáng kể vào tỷ lệ dung môi/nguyên liệu được sử dụng.

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là một trong những thông số quyết định hiệu quả thu nhận polyphenol. Nhận định này phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Cụ thể, Liu et al. (2024) báo cáo rằng tỷ lệ 50 mL/g kết hợp với ethanol 60% cho hiệu quả trích ly polyphenol cao nhất từ bã nhò bằng cả phương pháp trích ly thông thường và hỗ trợ siêu âm. Tương tự, Vuong et al. (2011) cũng ghi nhận tỷ lệ dung môi/nguyên liệu ảnh hưởng đáng kể đến khả năng thu nhận catechin và polyphenol từ lá trà xanh. Nhóm tác giả ghi nhận tỷ lệ nước/trà: 20/1 (mL/g) cho hiệu suất chiết catechin tối ưu. Các tác giả cho rằng việc gia tăng lượng dung môi giúp tăng khả năng hòa tan và khuếch tán các hợp chất phenolic vào môi trường chiết; tuy nhiên, khi vượt quá tỷ lệ thích hợp, hiệu quả thu hồi tăng không đáng kể do hệ dần đạt trạng thái cân bằng khuếch tán.

Các kết quả này cho thấy tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là một thông số quan trọng cần được tối ưu hóa nhằm nâng cao hiệu quả thu hồi các hợp chất phenolic từ nguyên liệu thực vật. Căn cứ vào kết quả khảo sát, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 50 mL/g được chọn làm điều kiện cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

3.3. Tác động của nhiệt độ

Nhiệt độ là một trong những yếu tố then chốt chi phối hiệu quả trích ly các hợp chất sinh học từ lá cây diếp cá. Sự gia tăng nhiệt độ làm tăng động năng của các phân tử dung môi, từ đó thúc đẩy quá trình hòa tan và khuếch tán các hoạt chất ra khỏi mô thực vật. Kết quả thực nghiệm cho thấy, trong khoảng nhiệt độ từ 40°C đến 65°C, hàm lượng polyphenol toàn phần của cao chiết tăng dần, đạt cực đại tại 55°C với

hàm lượng polyphenol là $123,142 \pm 0,539$ mg GAE/g cao chiết (Hình 1C). Tuy nhiên, khi nhiệt độ vượt quá 55°C , hoạt tính có xu hướng suy giảm, có thể do sự phân hủy nhiệt hoặc biến tính của các hợp chất phenolic không bền (Dai & Mumper, 2010). Do đó, 55°C được xem là mức nhiệt tối ưu cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm nâng cao hiệu suất trích ly hoạt chất từ nguyên liệu này.

3.4. Tác động của thời gian chiết

Thời gian trích ly là một trong những thông số quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất thu nhận polyphenol từ nguyên liệu thực vật. Việc tối ưu hóa thời gian không chỉ tác động đến hàm lượng và hoạt tính của cao chiết mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả kinh tế cũng như mức tiêu thụ năng lượng của quá trình trích ly. Trong nghiên cứu hiện tại, hiệu quả trích ly tăng dần khi kéo dài thời gian 1 đến 4 giờ, phản ánh qua sự gia tăng cả về tổng polyphenol ($127,299 \pm 0,485$ mg GAE/g cao chiết) (Hình 1D).

Xu hướng tương tự cũng đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trên các loài thực vật khác. Cacace and Mazza (2003) ghi nhận rằng việc gia tăng thời gian trích ly giúp cải thiện đáng kể hiệu suất thu hồi hợp chất phenolic từ quả berry nghiền do tăng cường quá trình khuếch tán và truyền khối giữa nguyên liệu và dung môi. Tương tự, Dai and Mumper (2010) cũng cho thấy thời gian tiếp xúc kéo dài giữa dung môi và nền thực vật góp phần nâng cao khả năng hòa tan và giải phóng các hợp chất polyphenol. Điều này cho thấy cơ chế gia tăng tổng polyphenol theo thời gian trích ly ở cây diếp cá có thể chịu ảnh hưởng bởi quy luật truyền khối tương tự như ở nhiều nguyên liệu thực vật giàu phenolic khác. Tuy nhiên, việc kéo dài thời gian trích ly vượt quá mức tối ưu không phải lúc nào cũng làm tăng hiệu quả thu hồi polyphenol. Một số nghiên cứu cho thấy thời gian trích ly kéo dài có thể làm giảm độ ổn định của các hợp chất phenolic do xảy ra quá trình oxy hóa hoặc phân hủy trong môi trường chiết, từ đó làm giảm hàm lượng polyphenol và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết (Nacz & Shahidi, 2006). Xu hướng tương tự đã được Spigno et al. (2007) ghi nhận trong nghiên cứu trên bã nho, trong đó thời gian trích ly được xác định là yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng hợp chất phenolic và hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết. Nghiên cứu này ghi nhận hiện tượng suy giảm hợp chất phenolic do phân hủy nhiệt khi thời gian chiết vượt quá 20 giờ, khi thời gian trích ly quá dài có thể dẫn đến sự phân hủy hoặc oxy hóa các hợp chất phenolic, từ đó làm giảm hàm lượng polyphenol và hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết.

Việc tổng hợp từ các kết quả trên giúp xác định rằng thời gian 4 giờ là phù hợp để tối ưu hóa hiệu quả thu nhận hàm lượng polyphenol tổng từ lá cây diếp cá trong nghiên cứu này.

3.5. Kết quả thiết kế mô hình Box-Behnken

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của từng yếu tố đơn lẻ cho thấy nồng độ dung môi (A), tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (B), nhiệt độ (C) và thời gian chiết (D) đều có tác động đáng kể đến hàm lượng polyphenol tổng (TPC). Dựa trên kết quả khảo sát ban đầu, bốn thông số này được lựa chọn để xây dựng mô hình tối ưu hóa theo thiết kế Box-Behnken. Bảng 1 tổng hợp giá trị TPC dự đoán từ mô hình và kết quả xác nhận bằng thực nghiệm. Giá trị TPC cao nhất đạt được tại điều kiện: nồng độ ethanol 90%, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 50/1 (mL/g), nhiệt độ 55°C trong thời gian 4 giờ. Các giá trị tối ưu đơn yếu tố được xác định khi các yếu tố khác cố định; trong mô hình đa biến, sự tương tác giữa các yếu tố làm thay đổi điểm tối ưu toàn cục.

Dựa trên dữ liệu thu được, phần mềm Design Expert 12.0 được sử dụng để tối ưu hóa các điều kiện chiết nhằm thu được hàm lượng TPC cao nhất. Kết quả phân tích hồi quy cho thấy mô hình bậc hai sau đây mô tả mối quan hệ giữa các yếu tố một cách tốt nhất:

$$\text{TPC} = 118,398 - 2,568A + 5,024B - 0,971C + 4,314D - 0,960AB - 2,456AC + 5,074AD - 5,248BC + 6,294BD + 1,890CD - 15,417A^2 - 9,579B^2 - 15,323C^2 - 15,573D^2$$

Phương trình trên cho thấy hàm lượng polyphenol phụ thuộc không chỉ vào tác động riêng lẻ của từng yếu tố, mà còn bị ảnh hưởng đáng kể bởi các tương tác đôi và tác động phi tuyến tính của các yếu tố. Các hệ số bình phương mang ý nghĩa thống kê cao, phản ánh sự tồn tại của các điểm tối ưu hoặc cực trị trong quy trình chiết - đây là cơ sở quan trọng để tối ưu hóa hiệu suất trích ly. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở hai mô hình còn lại, khi có sự phụ thuộc vào các yếu tố đơn lẻ, tương tác đôi và bình phương.

Phân tích ANOVA của mô hình tối ưu hóa (Bảng 2) cho thấy mô hình hồi quy được xây dựng có độ phù hợp cao với dữ liệu thực nghiệm. Giá trị Lack of Fit không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), trong khi hệ số xác định đạt $R^2 = 0,9707$; chứng tỏ mô hình giải thích tốt sự biến thiên của hàm lượng polyphenol tổng. Đồng thời, giá trị $F = 165,51$ cùng với $p < 0,0001$ xác nhận phương trình hồi quy có ý nghĩa thống kê và khả năng dự đoán tốt trong phạm vi nghiên cứu.

vi khảo sát. Kết quả ANOVA cho thấy các tương tác AC, AD, BC, BD và CD đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), chứng tỏ hiệu quả trích ly polyphenol không chỉ phụ thuộc vào từng yếu tố riêng lẻ mà còn chịu ảnh hưởng bởi sự phối hợp giữa các yếu tố khảo sát. Đặc biệt, tương tác giữa tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian trích ly (BD) có ảnh hưởng mạnh nhất trong các tương tác đôi, cho thấy việc gia tăng thời gian trích ly chỉ thực sự phát huy hiệu quả khi lượng dung môi phù hợp. Ngược lại, sự tương tác giữa nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (AB) không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), cho thấy hai yếu tố này chủ yếu tác động độc lập trong phạm vi khảo sát.

Các biểu đồ bề mặt đáp ứng ba chiều (3D) được sử dụng để mô tả ảnh hưởng tương tác giữa các thông số trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng (Hình 2). Trong mỗi biểu đồ, hai thông số được giữ ở mức trung tâm (mức 0), trong khi hai thông số còn lại được thay đổi trong phạm vi khảo sát.

Trong các nghiên cứu tối ưu hóa quy trình, phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology, RSM) được áp dụng rộng rãi nhờ khả năng mô tả đồng thời ảnh hưởng của các thông số và tương tác giữa chúng đối với biến đáp ứng, từ đó xác định điều kiện tối ưu của quá trình (Myers et al., 2016). Việc sử dụng phần mềm Design Expert để phân tích và mô phỏng các thí nghiệm cho phép xác định mô hình phù hợp và dự báo kết quả trích ly chính xác. Trong nghiên cứu này, nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian trích ly được lựa chọn làm các biến độc lập trong mô hình RSM để tối ưu hóa hàm lượng polyphenol tổng. Các biểu đồ bề mặt 3 chiều (3D surface plots) là công cụ trực quan hữu ích trong mô hình bề mặt đáp ứng, cho phép đánh giá ảnh hưởng tương tác giữa các yếu tố khảo sát và xác định vùng điều kiện tối ưu của quá trình trích ly (Bezerra et al., 2008). Biểu đồ 3D được sử dụng để minh họa ảnh hưởng tương tác giữa từng cặp thông số trích ly đối với hàm lượng polyphenol tổng. Độ cong của bề mặt và các đường đồng mức phản ánh cường độ tương tác giữa các thông số, đồng thời hỗ trợ xác định vùng điều kiện tối ưu của quá trình trích ly.

Các biểu đồ bề mặt đáp ứng cho thấy ảnh hưởng của các thông số trích ly đến hàm lượng polyphenol tổng không tuân theo quan hệ tuyến tính mà xuất hiện vùng tối ưu trong phạm vi thiết kế thí nghiệm. Điều này cho thấy mô hình RSM có khả năng mô tả tốt mối quan hệ giữa các thông số và biến đáp ứng, đồng thời hỗ trợ xác định điều kiện trích ly thích hợp.

Hàm kỳ vọng được xác định trên cơ sở phương trình hồi quy thu được từ mô hình RSM (Hình 3). Phương trình này được thiết lập từ các nghiệm thức của thiết kế Box-Behnken và mô tả ảnh hưởng của từng thông số trích ly cũng như các tương tác giữa chúng đối với hàm lượng polyphenol tổng. Kết quả tối ưu hóa bằng phần mềm Design-Expert xác định điều kiện trích ly thích hợp để thu nhận cao chiết giàu polyphenol từ lá điệp cá gồm: nồng độ ethanol 89,66%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 53,50 mL/g, nhiệt độ 54,62°C và thời gian trích ly 4,39 giờ. Theo mô hình RSM, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) dự đoán đạt 119,807 mg GAE/g cao chiết. Thực nghiệm kiểm chứng cho giá trị TPC là $118,373 \pm 0,250$ mg GAE/g cao chiết và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với giá trị dự đoán ($p > 0,05$). Sự tương đồng giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm khẳng định mô hình có độ phù hợp cao và khả năng dự đoán đáng tin cậy. Kết quả kiểm chứng cho thấy hàm lượng polyphenol tổng đạt $118,373 \pm 0,250$ mg GAE/g cao chiết, tương ứng với hiệu suất thu hồi cao chiết là 18,5%. Điều này cho thấy quy trình tối ưu không chỉ nâng cao hàm lượng polyphenol trong cao chiết mà còn bảo đảm khả năng thu hồi cao chiết ở mức phù hợp cho các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo. Sự tương đồng giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm khẳng định tính phù hợp của mô hình tối ưu hóa, đồng thời cho thấy khả năng ứng dụng của mô hình trong việc tối ưu hóa quá trình thu nhận polyphenol từ lá điệp cá.

3.6. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết lá cây điệp cá được đánh giá bằng hai phương pháp phổ biến là DPPH và ABTS⁺, qua đó xác định khả năng trung hòa các gốc tự do của mẫu chiết. Dựa trên dữ liệu thể hiện ở Bảng 3, cả hai phép thử đều cho thấy cao chiết tối ưu từ lá điệp cá có tiềm năng kháng oxy hóa đáng kể, với giá trị IC₅₀ lần lượt là 113,73 µg/mL (DPPH) và 21,39 µg/mL (ABTS⁺). Mặc dù hoạt tính này thấp hơn các chất đối chứng chuẩn như ascorbic acid và trolox - vốn là các chất chống oxy hóa tinh khiết có hiệu lực mạnh - nhưng cao chiết vẫn cho thấy khả năng loại bỏ gốc tự do đáng kể. Hoạt tính kháng oxy hóa ghi nhận được nhiều khả năng có liên quan đến hàm lượng polyphenol hiện diện trong cao chiết. Ngoài ra, hoạt tính theo ABTS mạnh hơn DPPH có thể do ABTS đánh giá được cả chất kháng oxy hóa thân nước và thân lipid, trong khi DPPH chủ yếu phản ánh khả năng cho proton trong môi trường hữu cơ.

Khả năng trung hòa các gốc tự do DPPH và ABTS⁺ của cao chiết lá điệp cá cho thấy đây là

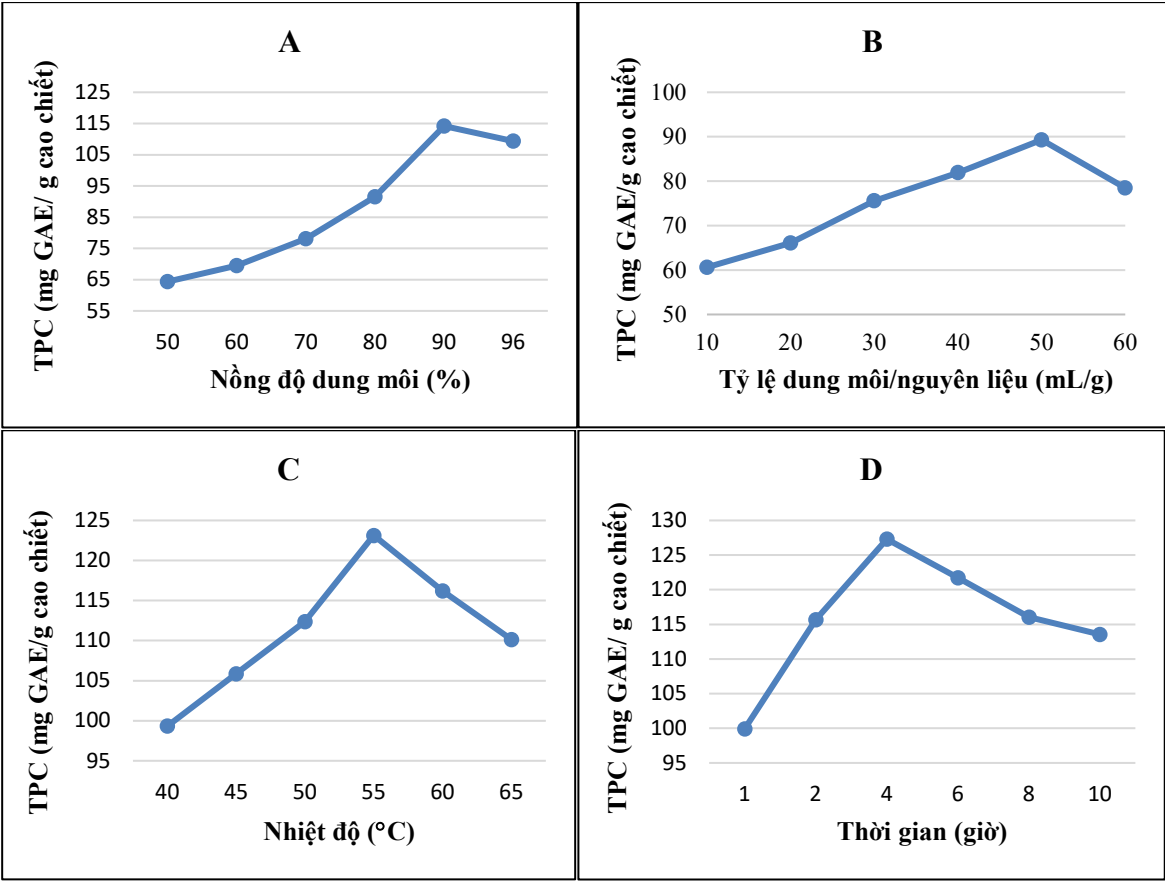
nguồn giàu các hợp chất có hoạt tính kháng oxy hóa. Nhận định này phù hợp với báo cáo của Charachit et al. (2022), khi phân đoạn ethyl acetate giàu polyphenol từ lá diếp cá cũng thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa đáng kể với giá trị IC_{50} lần lượt là $21,7 \pm 1,4$ $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) và $4,5 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$ (ABTS^{•+}). Hoạt tính kháng oxy hóa cao hơn trong nghiên cứu của Charachit et al. (2022) có thể liên quan đến việc sử dụng phân đoạn ethyl acetate giàu các hợp chất flavonoid như hyperoside và quercitrin, trong khi nghiên cứu hiện tại sử dụng cao chiết ethanol tổng. Mặc dù cường độ hoạt tính khác nhau nhưng các kết quả đều cho thấy lá diếp cá là nguồn hợp chất polyphenol có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm hay thực phẩm chức năng.

Trước xu hướng phát triển các chất kháng oxy hóa từ nguồn tự nhiên, nhiều nghiên cứu đã khẳng định tiềm năng ứng dụng của thực vật trong lĩnh vực dược phẩm và chăm sóc sức khỏe. Các chất kháng oxy hóa tự nhiên được đánh giá có độ an toàn cao, đồng thời góp phần bảo vệ tế bào trước stress oxy hóa thông qua cơ chế trung hòa gốc tự do và tăng cường hệ thống chống oxy hóa nội sinh (Lourenço et al., 2019). Các kết quả trên cho thấy cao chiết lá diếp cá là nguồn nguyên liệu giàu polyphenol, có khả năng được ứng dụng trong phát triển các sản phẩm kháng oxy hóa có nguồn gốc tự nhiên.

Bảng 1. Kết quả khảo sát hàm lượng TPC

Thí nghiệm	Các biến độc lập				TPC (mg GAE/g cao chiết)	
	Nồng độ (%)	Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Thực nghiệm	Dự đoán
1	84	40/1	55	4	$86,043 \pm 0,370^{ijk}$	89,986
2	84	60/1	55	4	$103,340 \pm 0,563^c$	101,954
3	96	40/1	55	4	$83,169 \pm 0,209^{kl}$	86,769
4	96	60/1	55	4	$96,628 \pm 0,557^d$	94,898
5	90	50/1	50	2	$85,479 \pm 1,896^{ijk}$	86,050
6	90	50/1	60	2	$77,094 \pm 1,209^m$	80,327
7	90	50/1	50	6	$91,916 \pm 0,317^{fg}$	90,897
8	90	50/1	60	6	$91,092 \pm 0,646^{fg}$	92,735
9	90	40/1	55	2	$92,119 \pm 0,634^{ef}$	90,203
10	90	60/1	55	2	$85,885 \pm 0,072^{ijk}$	87,663
11	90	40/1	55	6	$88,561 \pm 1,459^{ghi}$	86,242
12	90	60/1	55	6	$107,503 \pm 0,654^b$	108,878
13	84	50/1	50	4	$90,750 \pm 0,965^{fgh}$	88,741
14	96	50/1	50	4	$86,676 \pm 0,140^{ij}$	88,517
15	84	50/1	60	4	$94,094 \pm 0,834^{def}$	91,711
16	96	50/1	60	4	$80,195 \pm 0,861^{lm}$	81,662
17	90	40/1	50	4	$84,705 \pm 2,805^{jk}$	84,195
18	90	60/1	50	4	$103,613 \pm 1,145^c$	104,739
19	90	40/1	60	4	$95,547 \pm 0,543^{de}$	92,749
20	90	60/1	60	4	$93,463 \pm 0,337^{def}$	92,301
21	84	50/1	55	2	$90,815 \pm 2,632^{fg}$	90,737
22	96	50/1	55	2	$79,038 \pm 0,717^m$	75,452
23	84	50/1	55	6	$87,303 \pm 0,546^{hij}$	89,216
24	96	50/1	55	6	$95,821 \pm 0,753^d$	94,228
25	90	50/1	55	4	$117,406 \pm 1,554^a$	118,398
26	90	50/1	55	4	$118,479 \pm 1,051^a$	118,398
27	90	50/1	55	4	$119,809 \pm 0,571^a$	118,398
28	90	50/1	55	4	$116,615 \pm 0,891^a$	118,398
29	90	50/1	55	4	$119,679 \pm 0,716^a$	118,398

Ghi chú: Các giá trị có các chữ cái theo sau trong cùng một cột khác nhau thì sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%.



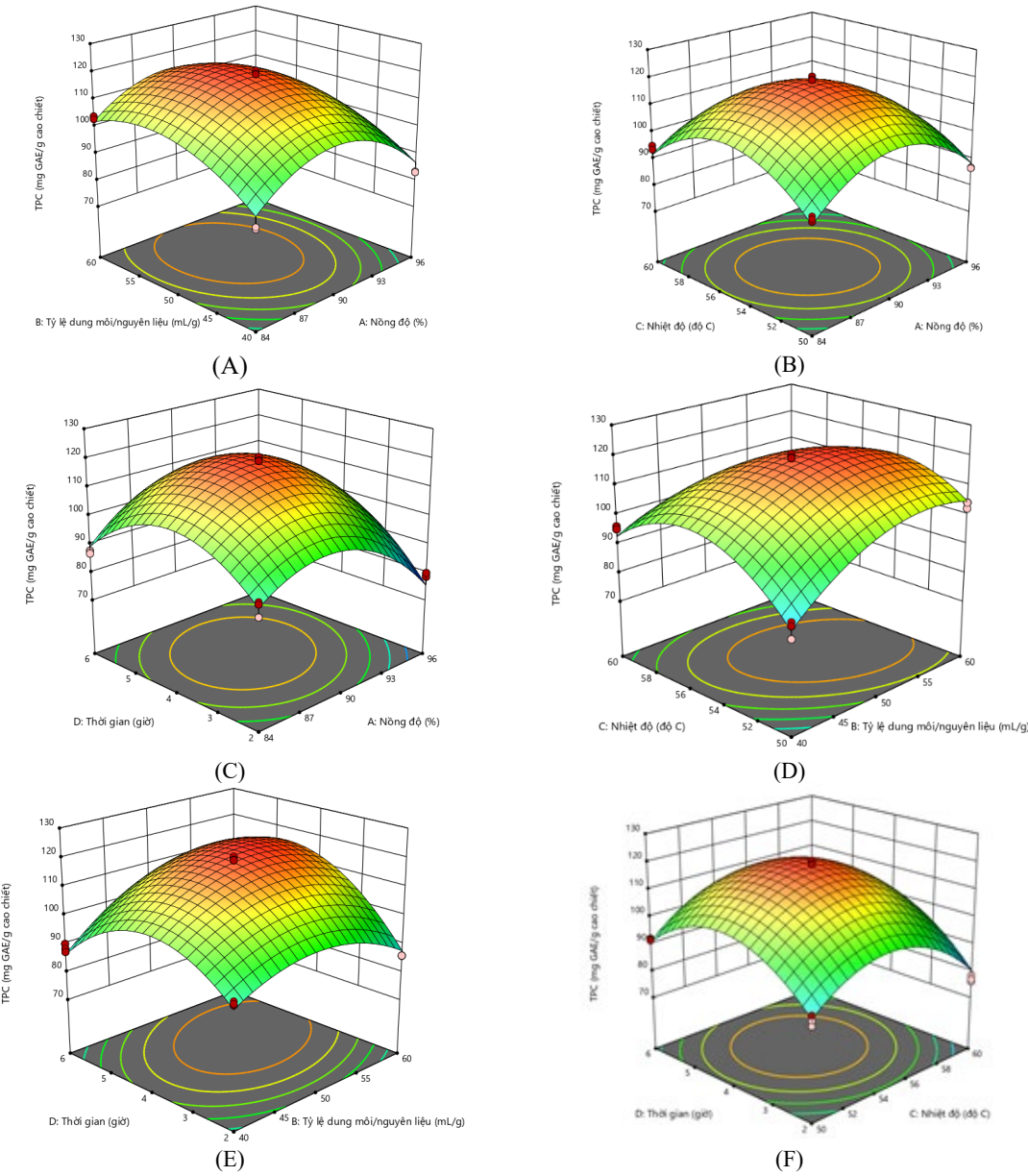
Hình 1. Hàm lượng polyphenol ly trích từ điệp cá ở các điều kiện khảo sát đơn yếu tố

Ghi chú: A-Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol; B-Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hàm lượng polyphenol; C-Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol; D-Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng polyphenol tổng.

Bảng 2. Phân tích ANOVA của các yếu tố dựa trên kết quả thực nghiệm

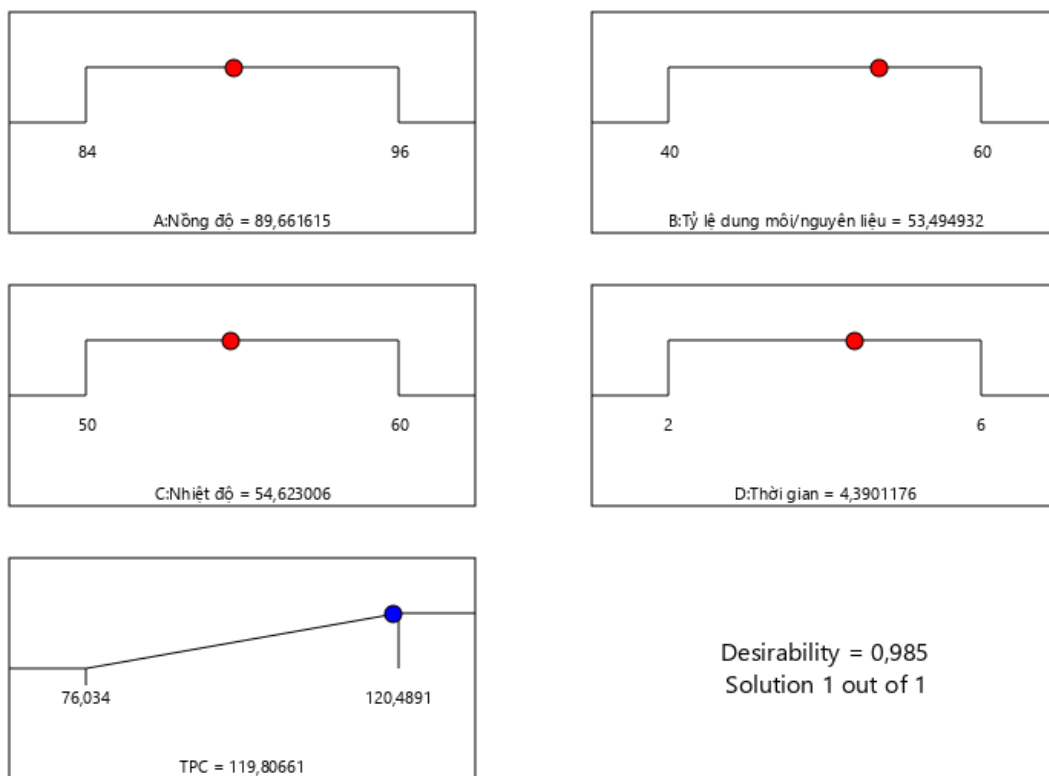
Source	Sum of Squares	df	MeanSquare	F-value	p-value
Block	9,26	2	4,63		
Model	13.404,46	14	957,46	165,51	< 0,0001
A - nồng độ	237,45	1	237,45	41,05	< 0,0001
B - tỉ lệ dung môi/nguyên liệu	908,68	1	908,68	157,08	< 0,0001
C - nhiệt độ	33,96	1	33,96	5,87	0,0180
D - thời gian	669,90	1	669,90	115,80	< 0,0001
AB	11,05	1	11,05	1,91	0,1713
AC	72,39	1	72,39	12,51	< 0,0001
AD	308,94	1	308,94	53,40	< 0,0001
BC	330,51	1	330,51	57,13	0,0007
BD	475,38	1	475,38	82,18	< 0,0001
CD	42,88	1	42,88	7,41	0,0082
A ²	4.625,20	1	4.625,20	799,53	< 0,0001
B ²	1.785,47	1	1.785,47	308,64	< 0,0001

Source	Sum of Squares	df	MeanSquare	F-value	p-value
C ²	4.569,02	1	4.569,02	789,82	< 0,0001
D ²	4.718,98	1	4.718,98	815,74	<0,0001
Residual	404,94	70	5,98		
Lack of Fit	371,34	58	6,40	2,29	0,0586
Pure Error	33,60	12	2,80		
Cor Total	13.818,66	86	R ² = 0,9707	R ² _{adj} = 0,9648	R ² _{Pre} = 0,9532



Hình 2. Mô hình bề mặt đáp ứng (RSM) của quy trình trích ly polyphenol từ lá cây Diếp cá

Ghi chú: Biểu đồ 3D surface plot của (A): nồng độ dung môi tương tác với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu; (B): nồng độ dung môi tương tác với nhiệt độ trích ly, (C): nồng độ dung môi tương tác với thời gian trích ly, (D): tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tương tác với nhiệt độ trích ly, (E): tỷ lệ dung môi/nguyên liệu tương tác với thời gian trích ly, (F): nhiệt độ tương tác với thời gian trích ly.



Hình 3. Hàm kỳ vọng trong mô hình bề mặt đáp ứng

Bảng 3. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết từ lá cây diếp cá

Cao chiết	IC ₅₀ (μg/mL)	
	DPPH	ABTS
Cao chiết tối ưu	113,73 ± 0,37	21,39 ± 0,11
Đối chứng		
Vitamin C	4,60 ± 0,06	
Trolox		3,17 ± 0,02

4. KẾT LUẬN

Cây diếp cá là nguồn dược liệu có nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý, trong đó khả năng kháng oxy hóa là một đặc tính nổi bật. Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology, RSM) kết hợp với thiết kế Box-Behnken được áp dụng nhằm tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol từ lá diếp cá. Kết quả xác định điều kiện trích ly tối ưu gồm nồng độ ethanol

89,66%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 53,50 mL/g, nhiệt độ 54,62°C và thời gian 4,39 giờ. Ở điều kiện này, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) dự đoán đạt 119,807 mg GAE/g cao chiết. Kết quả thực nghiệm trong điều kiện này cho thấy hàm lượng polyphenol là 118,373 ± 0,250 mg GAE/g cao chiết và hiệu suất điều chế cao chiết đạt 18,5%. Cao chiết tối ưu có hoạt tính kháng oxy hóa với giá trị IC₅₀ lần lượt là 113,73 μg/mL (DPPH) và 21,39 μg/mL (ABTS^{•+}). Kết quả xác nhận mô hình tối ưu hóa có khả năng dự đoán tốt và cho thấy tiềm năng khai thác cao chiết lá diếp cá giàu polyphenol. Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế, bao gồm việc chưa định danh các hợp chất hoạt tính cụ thể và hoạt tính kháng oxy hóa mới chỉ được đánh giá ở mức *in vitro*. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung xác định thành phần hóa học chủ yếu bằng các kỹ thuật phân tích hiện đại như HPLC/UPLC và đánh giá tác dụng trên các mô hình sinh học phù hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877.
https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. *Talanta*, 76(5), 965–977.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019
- Bộ Y Tế. (2017). *Dược điển Việt Nam V*.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389.
https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1
- Charachit, N., Sukhamwang, A., Dejkiengkraikul, P., & Yodkeeree, S. (2022). Hyperoside and quercitrin in houttuynia cordata extract attenuate uvb-induced human keratinocyte cell damage and oxidative stress via modulation of mapks and akt signaling pathway. *Antioxidants*, 11(2), 221.
https://doi.org/10.3390/antiox11020221
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 253875.
https://doi.org/10.1155/2014/253875
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
https://doi.org/10.3390/molecules15107313
- Do, Q. D., et al. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.
https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186.
https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011
- Hussen, E. M., & Endalew, S. A. (2023). *In vitro* antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 1–12.
https://doi.org/10.1186/S12906-023-03923-Y/FIGURES/6
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97, 2499–2574.
https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9
- Li, W., Fan, T., Zhang, Y., Fan, T., Zhou, P., & Niu, X. (2022). *Houttuynia cordata* Thunb.: A review of phytochemistry and pharmacology and quality control. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 916065.
https://doi.org/10.4236/cm.2013.43015
- Liu, Z., Wu, H., Holland, B., Barrow, C. J., & Suleria, H. A. R. (2024). *An Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from Grape Marc: A Comparison between Conventional and Ultrasound-Assisted Methods*. *Chemosensors*, 12(9), 177.
https://doi.org/10.3390/chemosensors12090177
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). *Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications*. *Molecules*, 24(22), 4132.
https://doi.org/10.3390/molecules24224132
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). John Wiley & Sons.
- Nacz, M., & Shahidi, F. (2006). *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542.
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002
- Nguyen, M. H., Tran, T. H., Do, B. M., Ha, T. L., & Le, M. T. (2021). Application of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted flavonoid-rich extraction of fish mint (*Houttuynia cordata* Thunb.). *VNUHCM Science and Technology Development Journal*, 24(3),

- 1994–2003.
<https://doi.org/10.32508/stdj.v24i3.2535>.
- Nguyen, M. H., Nguyen T. L., Nguyen L. T. H., Chau N. T. N., Nguyen, T. Y. N., Ha, T. D., Nguyen, T. P. T., Chu, T. B., Tran, C. H., & Le, M. T. (2024). Response surface methodology for aqueous two-phase system extraction: An unprecedented approach for the specific flavonoid-rich extraction of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves towards acne treatment. *Heliyon*, 10(4), e25245.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25245>.
- Park, H. J., Kim, D. H., Choi, J. W., Chung, Y. S., & Moon, K. D. (2023). Antioxidant and cytoprotective effects of flavonoids isolated from *Houttuynia cordata* against oxidative stress-induced cellular damage. *Antioxidants*, 12(5), 1048.
<https://doi.org/10.3390/antiox12051048>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabirmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K., & Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 806470.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Sikder, M. M., Li, X., Akumwami, S., & Labony, S. A. (2025). Reactive oxygen species: Role in pathophysiology, and mechanism of endogenous and dietary antioxidants during oxidative stress. *Chonnam Medical Journal*, 61(1), 32–45.
<https://doi.org/10.4068/cmj.2025.61.1.32>
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). *Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Sun, S., Liu, Z., Lin, M., Gao, N., & Wang, X. (2024). Polyphenols in health and food processing: antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant insights. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1456730.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1456730>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., & Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120(1), 290–295.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>
- Wu, X., Yan, L., Li, J., & Tan, Z. (2025). Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata*. *Foods*, 14(4), 558.
<https://doi.org/10.3390/foods14040558>
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2011). Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of Separation and Purification Technology*, 120, 52–58.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201000863>