

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN CHIẾT FLAVONOID KHÁNG OXI HÓA, KHÁNG KHUẨN TỪ QUẢ CAU (*Areca catechu* L.)

Đến tòa soạn 13-06-2023

Chu Thị Thanh, Đoàn Thị Thúy Ái, Vũ Thị Huyền*

Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: vthuyen@vnua.edu.vn

SUMMARY

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL FLAVONOID COMPOUNDS FROM *Areca catechu* L. FRUIT

This study was conducted to optimize the extraction conditions for flavonoid compounds from *Areca catechu* L. fruit, to evaluate the antibacterial and antioxidant activities of these compounds. In the single-factor method, three factors have been identified that strongly influence on the flavonoid content, including extraction temperature, extraction time and solvent concentration. The influence levels of the factors were established according to the Box-Behnken design, and the response surface method was designed to optimize the levels of the factors. The model describing the extraction process of flavonoid compounds (Y , μg quercetin equivalent/g dry weight) with three influencing factors including temperature (X_1), time (X_2) and solvent concentration (X_3) was built as follows: $Y = -11445,760 - 31,410X_1 + 14,455X_2 + 279,663X_3 - 0,043X_1X_2 - 0,336X_1X_3 - 0,041X_2X_3 + 0,548X_1^2 - 0,038X_2^2 - 1,342X_3^2$ và $Y_2 = 0,527 - 0,015X_1 - 0,005X_2 + 0,078X_3$ with $R^2 = 0.913$. According to the model, the optimal extraction conditions for the highest flavonoid content were the temperature of 61.87°C , the time of 103.85 minutes, and the methanol of 94.84% (v/v). Under these conditions, the extract obtained had a flavonoid content of $1645.03 \mu\text{g}$ quercetin/g DW and antioxidant capacity of $6.46 \pm 0.11 \text{ mg}$ ascorbic acid equivalent/g dry weight. This extract also showed strong antibacterial ability against some bacterial strains such as *S. aureus* ($\text{IC}_{50} = 158.8 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$), *S. enterica* ($\text{IC}_{50} = 128.6 \pm 6.4 \mu\text{g/ml}$), *E. coli* ($\text{IC}_{50} = 16.0 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$).

Keywords: *Areca catechu* L. fruit, total flavonoid content, antimicrobial, antioxidant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cau có tên khoa học là *Areca catechu* L. được phân bố rộng rãi ở các nơi khác nhau trên thế giới. Ước tính rằng hơn 600 triệu người tiêu thụ cau trên thế giới, trong đó, mức sử dụng nhiều ở các nước Châu Á [1]. Quả cau được sử dụng để điều trị nhiều bệnh như bệnh bạch bì, bệnh phong, thiếu máu, béo phì. Ở Trung Quốc, quả cau được sử dụng để loại bỏ giun đường ruột từ thế kỷ thứ 6 và vẫn được sử dụng trong một số lĩnh vực như thú y [2]. Ở Việt Nam, các bộ phận của cây cau được dùng nhiều trong y học cổ truyền để chữa nhiều

bệnh như: hạt cau dùng chữa bệnh sán xơ mít, sán lá, chữa viêm ruột... vỏ quả cau dùng trị thủy thũng, bụng đầy trướng, bí tiểu tiện; rễ cau nổi có tác dụng bổ dương, chữa đái nhắt [3]. Đặc biệt, theo phong tục của người Việt Nam, quả cau là lễ vật không thể thiếu trong lễ hiếu, hi.

Quả cau có một số thành phần chính như phenolic (31,1%), polysaccharid (18,7%), chất béo (14,0%), chất xơ (10,8%) và alkaloid (0,5%) [4]. Flavonoid có đặc tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, có tác dụng ức chế tế bào trong quá trình hình thành khối u và khả năng ức chế các

enzyme phổ rộng. Vì vậy, nghiên cứu phương pháp thu nhận dịch chiết chứa hàm lượng flavonoid tổng cao từ quả cau là cần thiết, giúp nâng cao giá trị cho loại quả này. Tuy nhiên, để thu được dịch chiết có hàm lượng hoạt chất flavonoid cao cần quan tâm đến ảnh hưởng của nhiều yếu tố như loại dung môi, nồng độ dung môi, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ, thời gian... và phải tối ưu hóa các điều kiện kể trên. Một số kỹ thuật tối ưu hóa được phát triển như phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Method-RSM) hay trí tuệ nhân tạo (Artificial Neural Networks) [5]. Trong đó, RSM là phương pháp phổ biến để tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu thực vật [6-8].

Trong bài báo này, tối ưu các điều kiện chiết các hợp chất flavonoid, đồng thời đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa và kháng khuẩn của cao chiết từ quả cau với hi vọng nhằm khai thác hiệu quả nguồn tài nguyên này cũng như góp phần cung cấp thêm cơ sở khoa học cho việc sử dụng loài quả này trong thực phẩm, dược phẩm và tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Quả cau (*Areca catechu* L.) được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu là cau ăn quả loại bánh tẻ, được thu hái ở tỉnh Thái Bình vào tháng 10 năm 2020. Mẫu thực vật được rửa sạch để ráo và loại hạt, cắt thành mảnh nhỏ, sấy khô ở 40°C sau đó được nghiền nhỏ (0,3 mm), đựng trong lọ thủy tinh, bảo quản nơi khô ráo trong quá trình tiến hành thí nghiệm.

Các dung môi như methanol, ethanol, các thuốc thử nhôm clorua, kali acetat có độ tinh khiết phân tích được mua của Trung Quốc. Các chất chuẩn như quercetin, ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được mua của Sigma-Aldrich.

Các chủng vi sinh vật gồm 3 vi khuẩn Gram (+) là *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Lactobacillus fermentum* (N4); 3 vi khuẩn Gram (-) là *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

15442), *Salmonella enterica* và nấm *Candida albicans* (ATCC 10231).

Các môi trường nuôi cấy là MHB (Mueller-Hinton Broth), MHA (Mueller-Hinton Agar); TSB (Tryptic Soy Broth); TSA (Tryptic Soy Agar) cho vi khuẩn; SDB (Sabourand-2% dextrose broth).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tối ưu hóa điều kiện chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau

Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau được thực hiện theo phương pháp đơn yếu tố, trên nguyên tắc khi nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố nào thì yếu tố đó thay đổi, các yếu tố còn lại giữ nguyên. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả của thí nghiệm trước. Bột quả cau được chiết bằng dung môi methanol ở các nồng độ khác nhau (60-100 %, v/v), với tỉ lệ nguyên liệu dung môi (1/15-1/30, m/v), nhiệt độ (30-70°C), thời gian chiết (30-150 phút). Khi kết thúc quá trình chiết, hỗn hợp được li tâm bằng máy li tâm với tốc độ 4000 rpm trong 20 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch trong được đem xác định hàm lượng flavonoid và khả năng kháng oxy hóa.

Tối ưu hóa ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình chiết các hợp chất flavonoid được thực hiện sau khi xác định các yếu tố ảnh hưởng từ thí nghiệm đơn yếu tố. Từ kết quả khảo sát một yếu tố, ba thông số chính cần tối ưu đó là nhiệt độ chiết (X_1 , °C), thời gian chiết (X_2 , phút) và nồng độ dung môi (X_3 , v/v). Khoảng biến động cho nhiệt độ chiết: 50-70°C, khoảng biến đổi 10°C; thời gian chiết: 60-120 phút, khoảng biến đổi 30 phút; nồng độ dung môi: 80-100%, khoảng biến đổi 10%. Thí nghiệm tối ưu hóa các thông số của quá trình chiết được thực hiện theo thiết kế Box-Behnken nhờ phần mềm Minitab phiên bản 16.0.

Xác định các tham số ước tính của mô hình phân tích hồi qui theo phương pháp đáp ứng bề mặt và dự báo hàm lượng flavonoid tổng số cao nhất bằng hàm max(predict) của phần mềm Minitab phiên bản 16.0. Mô hình có dạng: $Y (\mu\text{g QE/g CK}) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}(X_1X_2) + b_{13}(X_1X_3) + b_{23}(X_2X_3)$.

Trong đó: X_1 là nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$); X_2 là thời gian (phút); X_3 là nồng độ dung môi (% v/v).

2.2.2. Định lượng flavonoid tổng số (TFC)

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định bằng phương pháp so màu [9]. Thêm vào đó 0,1 ml AlCl_3 10% vào 1,0 ml dung dịch chuẩn quercetin hoặc mẫu, lắc đều. Thêm tiếp vào hỗn hợp phản ứng 0,1 mL CH_3COOK 1M. Cuối cùng, bổ sung 2,8 mL nước cất, lắc đều và để yên 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 422 nm và xây dựng đường chuẩn $y = 0,0209x - 0,002$ với $R^2 = 0,9997$. Hàm lượng flavonoid được biểu diễn theo μg đương lượng quercetin (Quercetin Equivalent - QE) trên 1 g chất khô mẫu phân tích (hay μg QE/g CK).

2.2.3. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa được đánh giá bằng cách đo hoạt tính trung hòa gốc tự do thông qua phản ứng mất màu tím của dung dịch DPPH theo phương pháp được mô tả bởi [10]. Cho 3 mL dung dịch DPPH 0,1 mM vào 1 mL mẫu dịch chiết đã pha loãng 10 lần. Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và so màu tại bước sóng 517 nm. Hoạt tính chống oxy hóa đo bằng % khử gốc tự do DPPH được tính theo công thức sau: % khử DPPH = $[(A_0 - A_x)/A_0] \times 100\%$. Trong đó: A_0 là độ hấp thụ quang của mẫu trắng không chứa dịch chiết (mẫu control); A_x là độ hấp thụ quang của mẫu thử. Ascorbic acid được dùng làm chất chuẩn. Do đó, khả năng kháng oxy hóa được biểu diễn theo mg tương đương ascorbic acid (Ascorbic Acid Equivalent - AAE) trên 1 g chất khô hay mg AAE/g CK.

2.2.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua độ đục của môi trường nuôi cấy [11]. Vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa bằng môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ vi khuẩn đạt 5×10^5 CFU/ml. Mẫu ban đầu được pha loãng 2 bước trong DMSO 100% và nước cất tiệt trùng thành một dãy 4 nồng độ, từ 4 đến 256 $\mu\text{g/mL}$ với cao chiết. Vi sinh vật kiểm định được lưu giữ ở -80°C . Lấy 10 μL dung dịch mẫu thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190 μL dung

dịch vi khuẩn đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở 37°C trong 24h. Ampicillin và Cefotaxime được sử dụng làm chất đối chứng dương tương ứng cho vi khuẩn gram (+) và vi khuẩn gram (-). Giá trị thể hiện hoạt tính là nồng độ ức chế 50% (IC_{50} -50% Inhibitor Concentration).

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được biểu diễn ở dạng $\text{TB} \pm \text{SD}$. Phần mềm Minitab 16 được dùng để phân tích số liệu. Phân tích ANOVA một yếu tố được dùng để so sánh các giá trị trung bình nhờ phép so sánh Tukey với mức tin cậy 95%. Thí nghiệm mô hình hóa và tối ưu hóa được thực hiện theo thiết kế Box-Behnken và đánh giá kết quả bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Giá trị IC_{50} được xác định thông qua giá trị % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau

3.1.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau

Ảnh hưởng của nồng độ dung môi

Theo Azahar và cộng sự [5] thì nồng độ dung môi là yếu tố quan trọng nhất trong quá trình chiết các hợp chất thứ cấp nói chung và các hợp chất flavonoid nói riêng. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng dung môi là methanol với nồng độ khác nhau: 60%, 70%, 80%, 90% và 100% (v/v). Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20, nhiệt độ chiết ở 40°C và thời gian chiết trong 30 phút. Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 1 cho thấy nồng độ methanol có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng trích ly của TFC từ quả cau ở mức ý nghĩa $p < 0,05$. Hàm lượng flavonoid tăng khi tăng nồng độ methanol từ 60% đến 90% và đạt cực đại ở nồng độ 90% ($1127,64 \pm 21,89 \mu\text{g/g}$). Kết quả thu được đối với flavonoid phù hợp với các báo cáo trước đây [5, 7], khi nồng độ tăng thì hàm lượng flavonoid tăng. Điều đó có thể thích rằng sự gia tăng nồng độ dung môi hữu cơ đã thúc đẩy sự phá vỡ màng tế bào thực vật, giúp tăng cường tính thấm của dung môi vào nguyên liệu rắn [7]. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ lên 100% thì TFC

lại giảm. Đó là do, việc sử dụng hỗn hợp dung môi luôn cho hiệu quả tách chiết cao hơn so với việc sử dụng một loại dung môi tinh khiết [12]. Do vậy, dung môi methanol nồng độ 90% được lựa chọn dùng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Quá trình tách chiết là quá trình khuếch tán phân tử, ở đây khi sự chênh lệch nồng độ flavonoid trong nguyên liệu càng cao thì quá trình khuếch tán diễn ra càng mạnh và ngược lại. Sự khuếch tán xảy ra cho đến khi đạt trạng thái cân bằng thì dừng lại. Kết quả xác định ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi được thể hiện trong bảng 1 cho thấy tỉ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/20 đến 1/30 ảnh hưởng không có ý nghĩa đến TFC ở mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Điều đó chứng tỏ rằng hàm lượng các hợp chất flavonoid trong quả cau đạt cân bằng trong khoảng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi khảo sát, từ 1/20 đến 1/30 g/mL. Với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/25 và 1/30 sẽ gây lãng phí dung môi. Do đó, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/20 (g/mL) được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Nhiệt độ trích ly tác động đến khả năng hòa tan, tốc độ truyền khối và sự ổn định của các hợp chất cần tách chiết. Kết quả phân tích ảnh hưởng của nhiệt độ đến TFC được trình bày ở bảng 1 cho thấy, TFC trong dịch chiết tăng nhanh khi tăng nhiệt độ từ 30°C đến 60°C và đạt cực đại ở nhiệt độ 60°C. Thí nghiệm của Azahar và cộng sự [5]

cũng giải thích rằng hiện tượng này do nhiệt độ cao các phân tử chuyển động nhanh hơn làm cho mô thực vật bị vỡ và do đó cho phép dung môi hòa tan cao hơn cho đến khi nhiệt độ đạt đến khoảng nhiệt độ tối ưu thì dừng lại. Tuy nhiên ở nhiệt độ 70°C thì TFC có xu hướng giảm đi, có thể nhiệt độ cao làm phân hủy các hợp chất flavonoid. Vì vậy, nhiệt độ chiết thích hợp được chọn ở đây là 60°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian chiết

Bên cạnh điều kiện nhiệt độ thì thời gian chiết cũng có ảnh hưởng quan trọng đến hàm lượng flavonoid tổng số. Trong báo cáo của Azahar và cộng sự [5], tác giả đã chỉ ra rằng việc tăng hiệu suất flavonoid có thể đạt được một cách đáng kể khi tăng thời gian chiết ở bất kỳ mức nhiệt độ chiết nào. Kết quả ảnh hưởng của thời gian đến TFC được biểu diễn ở bảng 1. Quan sát kết quả nghiên cứu cho thấy kéo dài thời gian trích ly từ 30 phút đến 90 phút thì TFC trong dung môi tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, không có khác biệt đáng kể của TFC khi kéo dài thời gian trích ly lên 120 phút hay 150 phút. Điều này cũng có thể giải thích rằng thời gian chiết càng dài thì hàm lượng sản phẩm thu nhận được càng cao, nhưng đến một thời điểm nhất định thì hàm lượng sản phẩm thu được tăng lên không đáng kể hoặc có thể giảm đi, do có thể một số hợp chất bị phân hủy. Bên cạnh đó việc kéo dài thời gian trích ly sẽ tốn chi phí, tốn thời gian và có thể ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của flavonoid. Do đó, 90 phút sẽ được chọn là điều kiện tốt để trích ly.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng flavonoid tổng số của quả cau

Nồng độ methanol (% v/v)	60	70	80	90	100
	724,78±2,19 ^c	765,61±9,85 ^c	856,58±9,93 ^b	1127,64±21,89 ^a	873,50±22,99 ^b
Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	1/15	1/20	1/25	1/30	
	874,24±29,24 ^b	1127,64±21,87 ^a	1146,56±36,52 ^a	1166,13±55,30 ^a	
Nhiệt độ (°C)	30	40	50	60	70
	1084,72±23,06 ^b	1145,73±30,54 ^a	1155,93±39,39 ^a	1205,78±32,84 ^a	1181,33±27,34 ^a
Thời gian (phút)	30	60	90	120	150
	1084,72±23,06 ^b	1139,98±35,33 ^a	1205,45±37,44 ^a	1201,88±40,90 ^a	1174,09±27,48 ^a

Ghi chú: Trong cùng một hàng, số liệu mang các chữ cái khác nhau thì khác nhau với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3.1.2. Mô hình hóa quá trình tách chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau

Trong 4 yếu tố khảo sát ở trên, chúng tôi nhận thấy cả 4 yếu tố là nồng độ dung môi, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ chiết và thời gian chiết đều ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất flavonoid. Tuy nhiên, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi có ảnh hưởng ít nhất, ở tỉ lệ 1/20 (g/mL) trở lên, do đó, trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả

mô hình hóa 3 yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm mục tiêu Y (hàm lượng flavonoid), với các mức thí nghiệm được giới thiệu trong mục 2.2.1.

Với các mức thí nghiệm đã lựa chọn, bảng ma trận thực nghiệm được xây dựng và tiến hành thí nghiệm theo ma trận thực nghiệm với phân tích ba lần lặp lại của mỗi công thức thực nghiệm (Bảng 2).

Bảng 2. Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả xác định hàm lượng flavonoid của quả cau

STT	Thí nghiệm	Biến chuẩn			Biến thực			TFC (μg QE/g CK) (Y)
		X ₁	X ₂	X ₃	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Nồng độ methanol (% v/v)	
1	1	0	0	0	60	90	90	1509,11
2	2	-1	0	-1	50	90	80	1246,45
3	3	1	0	-1	70	90	80	1383,39
4	4	0	1	1	60	120	100	1515,98
5	5	-1	1	0	50	120	90	1676,65
6	6	0	-1	-1	60	60	80	1223,68
7	7	0	-1	1	60	60	100	1502,59
8	8	-1	0	1	50	90	100	1626,46
9	9	0	0	0	60	90	90	1544,66
10	10	0	0	0	60	90	90	1598,48
11	11	-1	-1	0	50	60	90	1528,18
12	12	1	-1	0	70	60	90	1491,01
13	13	0	1	-1	60	120	80	1285,79
14	14	1	0	1	70	90	100	1628,78
15	15	1	1	0	70	120	90	1588,22

Dựa vào phân tích số liệu thực nghiệm bằng phần mềm Minitab 16, đã xác định được giá trị các hệ số của mô hình trong bảng 3.

Bảng 3. Ước lượng tham số mô hình dự đoán và sự ảnh hưởng của các biến đến hàm mục tiêu

Hệ số	Giá trị	Độ lệch chuẩn	Giá trị t	Pr ($> t $)
Hệ số tự do	-11445,7699	1535,1185	-7,46	<0,0001*
Nhiệt độ (b ₁)	-31,4102	21,0368	-1,49	0,1444
Thời gian (b ₂)	14,4552	5,5874	2,59	0,0134*
Dung môi (b ₃)	297,6630	26,6803	10,48	<0,0001*
Nhiệt độ-Thời gian (b ₁₂)	-0,0427	0,0447	-0,96	0,3454
Nhiệt độ-Dung môi (b ₁₃)	-0,3366	0,1340	-2,51	0,0168*
Thời gian-Dung môi (b ₂₃)	-0,0406	0,0447	-0,91	0,3696
Nhiệt độ-Nhiệt độ (b ₁₁)	0,5476	0,1395	3,93	0,0004*
Thời gian-Thời gian (b ₂₂)	-0,0383	0,0154	-2,47	0,0184*

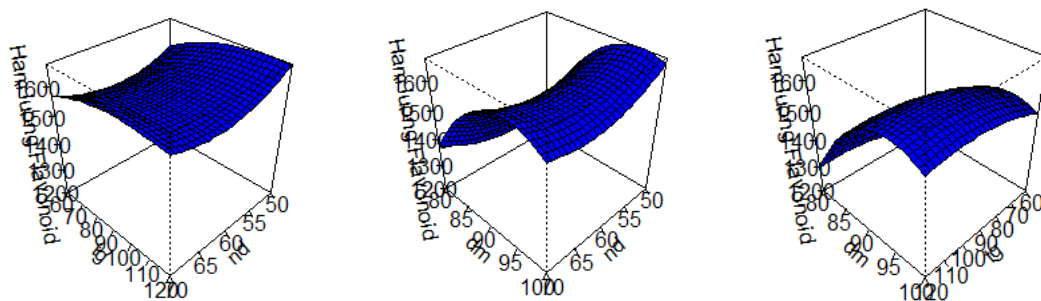
Hệ số	Giá trị	Độ lệch chuẩn	Giá trị t	Pr (> t)
Dung môi-Dung môi (b_{33})	-1,3424	0,1395	-9,63	<0,0001*

*. Mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Từ các hệ số của mô hình trong bảng 3, mô hình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, thời gian chiết, nồng độ dung môi đến hàm lượng flavonoid tổng số được biểu diễn như sau: $Y = -11445,7699 - 31,4102 X_1 + 14,4552 X_2 + 279,6630 X_3 - 0,0427 X_1X_2 - 0,3366 X_1X_3 - 0,0406 X_2X_3 + 0,5476 X_1^2 - 0,0383 X_2^2 - 1,3424 X_3^2$. Kết quả từ mô hình cho $R^2 = 91,34\%$, điều này cho thấy mô hình phản ánh 91,34% so với thực tế. Từ mô hình trên, chúng tôi nhận thấy 2 yếu tố thời gian chiết và nồng độ dung môi đều ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y là hàm lượng flavonoid tổng số ($p < 0,05$). Tuy nhiên, các yếu tố công nghệ khác nhau có chiều ảnh hưởng khác nhau. Các yếu tố thời gian chiết (X_2) và nồng độ dung môi (X_3) có ảnh hưởng theo tỉ lệ thuận đến hàm lượng flavonoid thu nhận (với giá trị p lần lượt là 0,0134 và $< 0,0001$) và bình phương của chúng cũng ảnh hưởng đến hàm này ($p = 0,0184$).

và $p < 0,0001$), trong khi đó cặp tương tác thời gian chiết-nồng độ dung môi không ảnh hưởng đến hàm mục tiêu ($p = 0,3696$). Yếu tố nhiệt độ riêng lẻ ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hàm mục tiêu Y là hàm lượng flavonoid tổng số ($p = 0,1444$), tuy nhiên, bình phương của nhiệt độ và cặp tương tác nhiệt độ-dung môi đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng flavonoid ($p < 0,05$).

Mô hình đáp ứng bề mặt (Hình 1) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố, đồng thời, dựa vào mô hình này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố ảnh hưởng làm cho hàm đáp ứng đạt giá trị cực đại. Kết quả đã tìm được điều kiện tối ưu để chiết xuất flavonoid từ quả cau với dung môi methanol 94,84% (v/v), nhiệt độ là 61,87°C, thời gian chiết là 103,85 phút. Ở điều kiện lý thuyết này, hàm lượng flavonoid dự tính thu nhận là 1645,03mg QE/g DW.



Slice at $nd = 61.87$, $tg = 103.85090135935$, $dm = 94.83800071564$

Hình 1. Mô hình đáp ứng bề mặt và sự ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến hàm lượng flavonoid tổng số

Sau đó, để kiểm tra lại mô hình, một thực nghiệm đã được thực hiện với nồng độ dung môi là 94,84%, nhiệt độ là 62°C và thời gian chiết là 103,85 phút. Với các điều kiện thực tế như trên, khi lặp lại thí nghiệm 3 lần, kết quả thực nghiệm đưa ra hàm lượng flavonoid thu nhận được là $1662,81 \pm 12,29 \mu\text{g QE /g DW}$. Kết quả thực nghiệm thu được lớn hơn 95% giá trị mà mô hình đã dự đoán. Như vậy, sự sai lệch giữa mô hình và thực nghiệm không có ý nghĩa thống kê. Điều đó chứng tỏ mô hình được lựa chọn phù hợp và dự

đoán một cách tương đối chính xác kết quả hàm lượng flavonoid. Cao chiết này được sử dụng để xác định khả năng kháng khuẩn và kháng oxi hóa.

3.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hóa của cao chiết giàu các hợp chất flavonoid từ quả cau

3.2.1. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết giàu các hợp chất flavonoid

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết giàu các hợp chất flavonoid từ quả cau thể hiện hoạt tính kháng

khuẩn với hầu hết các chủng thử nghiệm bằng 4. Kết quả phân tích chỉ ra, cao chiết giàu các hợp chất flavonoid có hoạt tính kháng mạnh nhất với chủng vi khuẩn *E. coli* (IC₅₀ là 16,0 ± 0,5 µg/mL) và *S. enterica* (IC₅₀ là 128,6 ± 6,4 µg/mL). Chủng vi khuẩn *E.coli* là vi khuẩn gây một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, viêm ly trực khuẩn. Chủng vi khuẩn *S. enterica* là vi khuẩn gây bệnh thương hàn, nhiễm trùng đường ruột ở người và động vật. Tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn của cao chiết với hai chủng vi sinh vật *L. fermentum* và *P. aeruginosa* thấp nhất. Chủng vi khuẩn *L. fermentum* là loại vi khuẩn đường ruột lên men có ích, thường có mặt trong hệ tiêu hóa của người và động vật. Như vậy, có thể sử dụng cao chiết này ức chế các chủng vi khuẩn gây bệnh đường ruột cho người và động vật, nhưng ảnh hưởng rất ít đến các chủng vi khuẩn có lợi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Abbas và cộng sự [13] khi nghiên cứu hiệu quả kháng khuẩn *in vitro* của chiết xuất ethanol từ hạt cau đối với các chủng vi khuẩn *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (vùng ức chế 15 mm), cũng như chống lại *B. subtilis* (vùng ức chế 9 mm). Negi và cộng sự [14] nghiên cứu khả năng kháng một số chủng vi khuẩn (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*) sử dụng cả dung dịch nước và hữu cơ (metanol, hexan, và axeton) được chiết xuất từ lá cau. Dữ liệu chỉ ra rằng, chiết xuất dạng nước hầu như

không có tác dụng kháng khuẩn (vùng vi khuẩn xâm nhập vào đĩa vi khuẩn ≤ 9 mm), trong khi chiết xuất metanol là hiệu quả nhất (18 mm < vùng ức chế < 22 mm) với tác dụng kháng khuẩn tương tự như tetracycline đối chứng (17 mm < vùng ức chế < 19 mm). So sánh khả năng kháng vi sinh vật kiểm định với các cao chiết có độ phân cực khác nhau từ loài hải miên *Xestospongia testudinaria* thấy rằng, cao chiết giàu các hợp chất flavonoid có khả năng kháng khuẩn cao hơn đối với tất cả các vi sinh vật kiểm định được thử nghiệm [15].

Nouri và cộng sự [16], đã đánh giá tính khả thi của việc sử dụng màng tinh bột Sago kết hợp với chiết xuất từ lá cau làm màng bao gói tiềm năng cho thực phẩm. Kết quả được công bố cho thấy màng được đánh giá với các hàm lượng chiết xuất khác nhau (5, 10, 20 và 30%) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với một số vi khuẩn Gram (+) (*S. aureus*, *S. epidermis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, và *Listeria monocytogenes*) và các chủng Gram (-) (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enterididis*, và *K. pneumonia*), với 7,1 < vùng ức chế < 18,1 mm. Chiết xuất alcol từ quả cau có hoạt tính kháng khuẩn chống lại 38 loại vi khuẩn, như *E. coli*, *Candida albicans*, vi khuẩn nhiệt đới và *interdactylobium*, đồng thời có tác dụng ức chế tốt đối với các vi khuẩn phổ biến trong miệng, như liên cầu, xạ khuẩn... [17].

Bảng 4. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của cao chiết giàu flavonoid từ quả cau

Tên mẫu	Giá trị (µg/ml)	Gram (+)			Gram (-)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cao chiết flavonoid từ quả cau	256	91	25	34	62	88	26
	64	10	16	20	44	75	20
	16	2	5	16	30	50	12
	4	0	4	4	26	21	6
	IC ₅₀	158,8±6,5	> 256	> 256	128,6±6,4	16,0±0,5	> 256
Ampicilin	IC ₅₀	0,02±0,005	3,62±0,15	1,03±0,07			
Cefotaxime	IC ₅₀				0,43±0,05	0,007±0,002	4,34±0,15

3.2.2. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết giàu các hợp chất flavonoid

Flavonoid là nhóm hợp chất phenol thực vật thứ cấp có đặc tính kháng oxy hóa. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra mối tương quan đáng kể giữa hoạt động

chống oxy hóa và hàm lượng flavonoid trong hầu hết các loại thực vật [18]. Khả năng kháng oxy hóa của ascorbic acid ở dãy nồng độ từ 2, 4, 6, 8, 10 ($\mu\text{g/mL}$) lần lượt là $9,03 \pm 0,49$; $26,86 \pm 0,89$; $35,17 \pm 0,00$ và $44,00 \pm 0,39$ %. Khả năng kháng oxy hóa của cao chiết giàu các hợp chất flavonoid từ quả cau tương đương với $6,46 \pm 0,11$ mg AAE/g CK. So sánh khả năng kháng oxy hóa của kết quả thu được với các công bố khác, tác dụng kháng oxy hóa của chiết xuất ethanol từ quả cau thấp hơn hydroxytoluene được butyl hóa, nhưng tương tự như tocopherol và cao hơn ascorbic acid [19]. Chiết xuất còn trong môi trường axit của hạt cau đã được sàng lọc về tiềm năng chống oxy hóa *in vitro* thông qua khử gốc tự do H_2O_2 với giá trị IC_{50} là $83,14 \mu\text{g/mL}$, có thể được coi là một chất chống oxy hóa tiềm năng [20].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được các yếu tố nồng độ methanol, nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng flavonoid tổng số của quả cau, trong đó, ba yếu tố nồng độ methanol, nhiệt độ chiết, thời gian chiết ảnh hưởng mạnh nhất. Do đó, ba yếu tố này được chọn để đưa vào mô hình mô tả quá trình chiết các hợp chất flavonoid từ quả cau.

Điều kiện chiết tối ưu cho phép thu được dịch chiết giàu các hợp chất flavonoid với nồng độ methanol 94,84% (v/v), nhiệt độ $61,87^\circ\text{C}$ và thời gian 103,85 phút. Ở điều kiện này, dịch chiết thu được có hàm lượng flavonoid tổng số là $1645,03 \mu\text{g QE/g CK}$ và khả năng kháng oxy hóa $6,46 \pm 0,11$ mg AAE/g CK. Đồng thời, cao chiết này có khả năng kháng một số chủng vi khuẩn như *S. aureus* ($\text{IC}_{50} = 158,8 \pm 6,5 \mu\text{g/mL}$), *S. enterica* ($\text{IC}_{50} = 128,6 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$), *E. coli* ($\text{IC}_{50} = 16,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp học viện của Học viện Nông nghiệp Việt Nam trong đề tài mã số: T2021-13-61.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Athukorala IA, Tilakaratne WM, Jayasinghe RD, (2021). *Areca* Nut Chewing: Initiation, Addiction, and Harmful Effects Emphasizing the

Barriers and Importance of Cessation. *Journal of Addiction*, **2021**(1), 9.

[2] Sharan RN, Mehrotra R, Choudhury Y, Asotra K, (2012). Association of betel nut with carcinogenesis: Revisit with a clinical perspective. *PLoS One*, **7**(8), 1-21.

[3] Đỗ Huy Bích, (2004). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

[4] Shen XL, Duan LL, (2009). Advances in chemical constituents and pharmacology of *Areca catechu* L. *J Yichun Coll*, **31**, 95-97.

[5] Khayet M, Cojocar C, Essalhi M, (2011). Artificial neural network modeling and response surface methodology of desalination by reverse osmosis. *Journal of membrane science*, **368**(1-2), 202-214.

[6] Azahar NF, Gani SSA and Mokhtar NFM, (2017). Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions of *Curcuma Zedoaria* leaves using response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, **11**(1), 1-10.

[7] Nguyen Tan Thanh, Nguyen Viet Cuong, Nguyen Thi Huyen, Tran Dinh Thang, Nguyen Ngoc Tuan, Doan Manh Dung, Tran Van Ngoc, (2021). Extraction process optimization of total phenolic and total flavonoid from leaves of *Phyllanthus urinaria* L. using the response surface methodology. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **26**(3), 220-225.

[8] Nguyễn Tân Thành, Phạm Minh Trang, Trương Chiến Thắng, Phan Tứ Quý, Phạm Thị Huyền Thoa, Nguyễn Thị Quý Vy, Đoàn Mạnh Dũng, (2022). Tối ưu hóa điều kiện trích ly saponin triterpenoid và flavonoid từ cây cà gai leo (*Solanum trilobatum* Linn) ở Nghệ An. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **27**(3), 211-217.

[9] Chang CC, Yang MH, Wen HM and Chern JC, (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **10**(3), 178-182.

[10] Paulpriya K, Lincy MP, Tresina PS and Mohan VR, (2015). In vitro antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of

aerial part extracts of *Daphniphyllum neilgherrense* (wt.) Rosenth. *J. Bio. Innov*, **4(6)**, 257-268.

[11] Pual C, Louis M, Jean-Bosco S, Arnold JV, Dirk VB, (2005). Bioassay for antibacterial and antifungal activities, Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygien, Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Belgium, 1-13.

[12] Chan SW, Lee CY, Yap CF, Aida WMW, Ho CW, (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, **16(2)**, 203-213.

[13] Abbas G, Kashif M, Mudassar, Khan TA, Bhatti HA, Haque S, Naqvi S, Farooq AD, (2018). Cytotoxic, embryotoxic, insecticidal and antimicrobial activities of standardized *Areca catechu* nut. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **31(2)**, 385–392.

[14] Negi BS, Dave BP, (2010). In vitro antimicrobial activity of *Areca Catechu* and its phytochemical analysis. *Indian Journal of Microbiology*, **50(4)**, 369–374.

[15] Tôn Nữ Liên Hương, Lưu Vũ Phương, (2022). Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và kháng vi sinh vật kiểm định của cao chiết từ loài hải miên *Xestospongia testudinaria*. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **27(3)**, 188-193.

[16] Nouri L, Mohammadi NA, (2014). Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves

extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, **66**, 254–259.

[17] Xiao Y, Yang Y, Yong J, Lu C, (2019). Chemical Components and Biological Activities of *Areca catechu* L., *Biomedical Research and Reviews*, **3**, 1-4.

[18] Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB, (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13(10)**, 572–584.

[19] Koleva II, Van Beek TA, Linssen A de Groot JPH, Evstatieva LN, (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, **13(1)**, 8-17.

[20] Bhandare AM, Kshirsagar AD, Vyawahare, NS, Hadambar AA, Thorve VS, (2010). Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. *Food and Chemical Toxicology*, **48(12)**, 3412–3417.