

Khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Lý Hải Triều¹, Nguyễn Thùy Diễm Thảo², Phùng Thị Thu Hường³,
Trần Bá Hiếu⁴, Lê Văn Minh^{1*}

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

⁴Trung tâm Thử nghiệm lâm sàng và Tương đương sinh học, Viện Nghiên cứu Y - Dược học Quân sự

Ngày nhận bài 1/4/2019; ngày chuyển phản biện 3/4/2019; ngày nhận phản biện 24/5/2019; ngày chấp nhận đăng 3/6/2019

Tóm tắt:

Lá Nhàu chứa nhiều hợp chất flavonoid với các hoạt tính sinh học khác nhau, từ lâu đã được dân gian sử dụng trong chữa bệnh. Nghiên cứu này thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết cao lá Nhàu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với 4 yếu tố: dung môi, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dược liệu/dung môi. Với 3 tiêu chí về hàm lượng flavonoid, hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính kháng viêm, điều kiện chiết tối ưu được xác định là nồng độ ethanol 70%, ở 60°C, trong 95 phút, tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/25 (g/ml). Cao chiết thu được ở điều kiện này có hàm lượng flavonoid toàn phần là 2,227 mg RU/g chất khô, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng kháng 11,5 mm ở nồng độ 100 mg/ml đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa*) và hoạt tính kháng viêm ($IC_{50}=70,21 \mu\text{g/ml}$). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao lá Nhàu có hàm lượng hoạt chất và hoạt tính cao được chiết ở điều kiện tương đối ôn hòa, cho thấy tính kinh tế và có thể ứng dụng rộng rãi ở quy mô công nghiệp.

Từ khóa: đáp ứng bề mặt, flavonoid, kháng khuẩn, kháng viêm, Nhàu (*Morinda citrifolia* L.), tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Cây Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) thuộc họ Rubiaceae được dân gian dùng trong chữa cao huyết áp; quả giúp nhuận tràng, lợi tiểu, chữa đái đường, ho, sốt, kinh nguyệt không đều; lá dùng chữa mụn nhọt, sốt rét, kiết lỵ, đầy hơi, đau bụng [1]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy gần 200 hợp chất đã được xác định và tách chiết từ những phần khác nhau của loài *Morinda citrifolia* và thể hiện nhiều tác dụng như kháng khuẩn, kháng viêm, kháng nấm, kháng oxy hóa, kháng ung thư, giảm đau, điều hòa miễn dịch, làm lành vết thương, các tác dụng trên xương... [2]. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu về bộ phận quả, rễ. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trên lá Nhàu cho thấy chúng có chứa steroid, glycosid, phenolic, tannin, terpenoid, alkaloid, carbohydrat, flavonoid, đường khử, saponin, anthroquinon. Trong đó, thành phần flavonoid được cho là có đóng góp vào các tác dụng của lá Nhàu. Một số hợp chất đã được phân lập như rutin, quercetin 3,7-O-dimethylether, quercetin 3-O-methylether, kaempferol 3,4'-O-dimethylether, kaempferol 5,7-O-diarabinosid, apigenin [3, 4].

Công nghệ chiết xuất dược liệu chú trọng đến các yếu tố

như hiệu suất chiết, điều kiện chiết hay quy trình (an toàn và kinh tế), khả năng triển khai ở quy mô sản xuất. Để nâng cao hiệu quả của cao chiết bán thành phẩm từ dược liệu, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất thường được tối ưu hóa. Thông thường, các nhà khoa học dùng phương pháp cổ điển là luân phiên từng biến để thay đổi các thông số khảo sát trong quá trình tối ưu hóa. Tuy nhiên, phương pháp này không thể hiện rõ ràng sự tương tác hay ảnh hưởng giữa các biến với nhau và tổng số thí nghiệm thực hiện tăng lên nhiều khi số lượng biến khảo sát tăng. Do đó, hiện nay trong nghiên cứu, các nhà khoa học thường sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) để tối ưu hóa các thông số trong quá trình chiết. Phương pháp này được phát triển dựa trên các kỹ thuật toán học và thống kê, dựa trên sự phù hợp và liên quan giữa kết quả thu được từ mô hình thực nghiệm và thiết kế thí nghiệm [5, 6]. Phương pháp RSM đã được ứng dụng trong tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hoạt chất tự nhiên, tổng hợp hóa học hay tối ưu hóa các quá trình hóa học khác [7, 8]. Điều này cho thấy phương pháp RSM có vai trò quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu để thay thế các phương pháp khác, giúp nâng cao hiệu quả quá trình tối ưu hóa các thông số. Do đó, trong

*Tác giả liên hệ: Email: levanminh05@gmail.com

Optimisation of the extraction conditions for Noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf extract using response surface methodology

Hai Trieu Ly¹, Thuy Diem Thao Nguyen²,
Thi Thu Huong Phung³, Ba Hieu Tran⁴, Van Minh Le^{1*}

¹Research Center of Ginseng and Medicinal Materials,
National Institute of Medicinal Materials

²University of Technology,

Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

⁴Clinical and Bio Equivalent Testing Center,
Institute of Biomedicine and Pharmacy

Received 1 April 2019; accepted 3 June 2019

Abstract:

Noni leaves have long been used as a traditional herb for the treatment of different ailments. Noni leaves have a high content of flavonoids with various biological activities. This study was carried out to optimise the extraction conditions of noni leaves using the response surface methodology with four factors, including solvent concentration, temperature, time, and material-solvent ratio. With the three criteria as total flavonoid content, antibacterial activity, and anti-inflammatory activity, the optimal extraction conditions of noni leaves were determined as follows: ethanol concentration of 70%, temperature of 60°C, time of 90 mins, and material-solvent ratio of 1/25 (g/ml). The extract obtained at these conditions had the total flavonoid content of 2.227 mg RU/g dry matter, exhibited antibacterial activity (zones of inhibition = 11.5 mm, at the concentration of 100 mg/ml against *P. aeruginosa*) and anti-inflammatory activity ($IC_{50}=70.21 \mu\text{g/ml}$). The study results showed that the noni leaf extract contains high levels of bioactive compound content and biological activities, can be extracted at relatively moderate conditions. This shows the economic advantages and wide applicability on an industrial scale.

Keywords: antibacterial, anti-inflammatory, flavonoid, Noni (*Morinda citrifolia* L.), optimisation, response surface methodology.

Classification number: 3.4

ngiên cứu này, chúng tôi sử dụng RSM để tối ưu hoá các thông số trong quá trình chiết cao lá Nhàu, góp phần tạo ra cao chiết tiềm năng cho các nghiên cứu sau này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

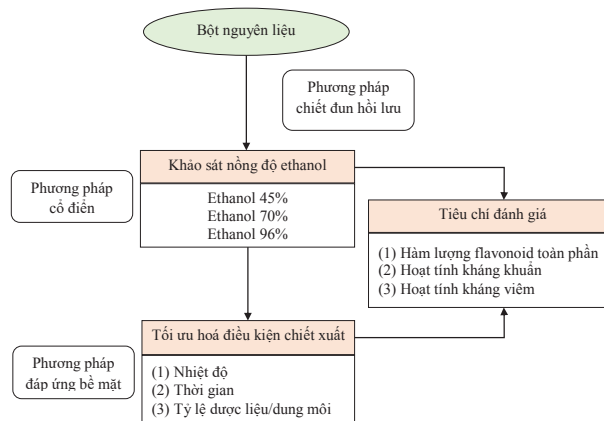
Lá Nhàu được thu tại Vườn bảo tồn gen và giống cây thuốc các tỉnh phía Nam (TP Hồ Chí Minh) vào tháng 3/2018. Mẫu được ThS Nguyễn Quốc Đạt - Viện Sinh thái học miền Nam xác định tên khoa học là *Morinda citrifolia* L.. Mẫu lá tươi được làm sạch, phơi sấy khô (độ ẩm: $7,80 \pm 0,06\%$) và xay thành bột để nghiên cứu. Mẫu dược liệu được bảo quản trong túi nilon kín và lưu giữ tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh (mã số lưu mẫu: MCL-TTS-001).

Hóa chất, dụng cụ

Ethanol 96% (Công ty Cổ phần dược phẩm OPC), Rutin (Sigma, Aldrich Co. Ltd, USA), Methanol (Merck), Diclofenac sodium (Sigma, Aldrich Co. Ltd, USA), Albumin trứng (HIMEDIA), viên amoxicilin 500 mg (Công ty Cổ phần dược phẩm DOMESCO), môi trường Luria-Bertani (LB), các chủng vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm bao gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Bình chiết hồi lưu, bình lắng gạn, bình hút ẩm, cu-vet thạch anh, đĩa petri và một số dụng cụ, hóa chất khác.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát nồng độ ethanol chiết xuất: nồng độ ethanol được khảo sát là 45, 70 và 96%, sử dụng phương pháp chiết đun hồi lưu với điều kiện chiết như sau: khối lượng nguyên liệu đem chiết là 5 g; nhiệt độ chiết là 80°C; thời gian chiết là 120 phút; tỷ lệ dược liệu: dung môi là 1:20 (g/ml). Tiêu chí đánh giá dựa vào (1) hàm lượng flavonoid toàn phần, (2) hoạt tính kháng khuẩn và (3) hoạt tính kháng viêm *in vitro* (sơ đồ 1).



Sơ đồ 1. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết cao lá Nhàu.

Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa: thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu sử dụng phương pháp chiết đun hồi lưu dựa trên các tiêu chí bao gồm: (1) hàm lượng flavonoid toàn phần, (2) hoạt tính kháng khuẩn và (3) hoạt tính kháng viêm *invitro* sử dụng RSM (sơ đồ 1). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Design-Expert 11.0.

Phân tích thống kê mô hình biểu diễn sự phụ thuộc của hàm mục tiêu vào các nhân tố được mã hóa là một phương trình đa thức bậc hai có dạng:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Trong đó: Y là hiệu suất dự đoán hàm mục tiêu; b_0 là hệ số hồi quy bậc 0; X_i là nhân tố độc lập thứ i ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y; b_i là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của nhân tố X_i với Y; b_{ii} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y; b_{ij} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y.

Bài toán tối ưu được lập dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của các hàm mục tiêu vào các nhân tố nhiệt độ, thời gian và thể tích. Điều kiện ràng buộc là giới hạn của vùng nghiên cứu.

Trong nghiên cứu, 3 yếu tố được lựa chọn có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất là nhiệt độ chiết (X_1), thời gian chiết (X_2) và tỷ lệ được liệu/dung môi hay thể tích dung môi (X_3). Giá trị biên của các nhân tố chiết được trình bày ở bảng 1. Số thí nghiệm $N = 2^k + 2k + 6$ ($N=20$ với $k=3$). Trong đó, k là số biến số độc lập và 2k là số thực nghiệm bổ sung tại điểm sao. Khoảng cách từ tâm đến điểm sao $\alpha=2^{k/4}$ ($\alpha=1,68$ với $k=3$). Tất cả các nghiên cứu được thực hiện ở 5 mức ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). Như vậy, trong nghiên cứu này 20 thí nghiệm sẽ được thực hiện với 2^3 số thí nghiệm của quy hoạch toàn phần, 6 thí nghiệm lặp lại tại tâm để đánh giá sai số và 6 thí nghiệm bổ sung tại điểm sao nằm cách vị trí tâm thực nghiệm một khoảng $\pm\alpha$. Các hàm mục tiêu bao gồm hàm lượng flavonoid toàn phần (Y_1), đường kính vòng kháng khuẩn (Y_2), IC_{50} kháng viêm (Y_3).

Bảng 1. Mã hóa các yếu tố và giá trị thực của yếu tố khảo sát.

Tên biến	Biến mã hóa	Mức nghiên cứu				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1 : nhiệt độ (°C)	U_1	50	60	75	90	100
X_2 : thời gian (phút)	U_2	60	95	150	205	240
X_3 : thể tích (ml)	U_3	235	300	400	500	600

Ghi chú: $\alpha=2$, $U_{\max}$, $U_{\min}$ là giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập; $U_0 = (U_{\min} + U_{\max})/2$ là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

Trong tất cả thí nghiệm, dịch chiết thu được sau quá trình chiết được cô quay dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay. Cao chiết được trữ ở 2-8°C và hoà trong dung môi thích hợp cho từng thí nghiệm.

Phương pháp định lượng flavonoid toàn phần: xác định hàm lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp UV-Vis theo chuẩn rutin. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch chiết (từ phân đoạn ethyl acetat), 8 ml methanol và 1 ml $AlCl_3$ 2% được lắc đều. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 431 nm. Hàm lượng flavonoid toàn phần được tính bằng mg đương lượng rutin có trong 1 g mẫu thử (mg RU/g) [9].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn in vitro: các chủng vi khuẩn thử nghiệm sau khi hoạt hoá có mật độ $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ CFU/ml được trải đều lên đĩa thạch Luria-Bertani bằng que trải vô trùng. Tạo giếng thạch có đường kính 6 mm. Cho vào mỗi giếng 100 μ l dịch cao chiết thử nghiệm ở nồng độ 100 mg/ml. Ủ các đĩa thạch ở 37°C trong 24 giờ. Sự khuếch tán của cao chiết ra môi trường thạch sẽ ức chế sự tăng trưởng của các chủng vi sinh vật khảo sát tạo thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch. Xác định đường kính vòng (ĐKV) kháng khuẩn (mm) theo công thức $\text{ĐKV} = \text{ĐKV}_{\text{mẫu thử}} - \text{ĐKV}_{\text{chứng âm}}$. Amoxicilin được sử dụng làm chứng dương, còn DMSO 10% được sử dụng như chứng âm. Khảo sát lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình [10].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro: hoạt tính kháng viêm của mẫu thử được đánh giá bằng phương pháp biến tính protein theo mô tả trước nhưng có một số sửa đổi nhỏ như sau: hỗn hợp phản ứng bao gồm 2 ml mẫu thử hoặc thuốc đối chiếu ở các nồng độ khác nhau và 2,9 ml dung dịch đệm PBS (pH=6,4) được trộn với 0,1 ml albumin trứng, ủ hỗn hợp ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Sự biến tính được tạo ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 70°C trong nước trong 10 phút. Làm mát và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 660 nm. Sử dụng nước cất 2 lần làm mẫu trắng. Diclofenac sodium, thuốc chống viêm không steroid được sử dụng làm thuốc đối chiếu. Mỗi thí nghiệm được thực hiện 3 lần và lấy trung bình. Tỷ lệ ức chế sự biến tính protein được tính bằng công thức sau:

$$I(\%) = (OD_c - OD_t)/OD_c$$

Trong đó: OD_c là độ hấp thụ của mẫu chứng âm; OD_t là độ hấp thụ của mẫu có chứa chất thử. Xác định giá trị IC_{50} để đánh giá % ức chế của mẫu khảo sát [11].

Xử lý số liệu: các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: Mean $\pm$ SEM. Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016, xử lý thống kê dựa vào phép kiểm tra t-test. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Design-Expert 11.0 để xây dựng mô hình toán học của quá trình chiết cũng như xác định các giá trị tối ưu.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm

Trong các nghiên cứu hiện nay, dung môi methanol hay ethanol thường được sử dụng để chiết xuất cao chiết tổng vì dung môi này có khả năng xuyên thấu qua màng tế bào thực vật, cũng như có thể tạo nối hydrogen liên phân tử với các nhóm phân cực khác, được xem là dung môi đa năng có thể chiết được nhiều hợp chất có độ phân cực khác nhau. Tuy nhiên, ethanol được ưu tiên sử dụng trong ngành dược và thực phẩm do an toàn và kinh tế hơn methanol. Trong nghiên cứu này, ethanol ở các nồng độ 45, 70 và 96% được lựa chọn để khảo sát, khối lượng nguyên liệu chiết là 5 g, nhiệt độ là 80°C, thời gian chiết là 120 phút, tỷ lệ được liệu/dung môi là 1/20 (g/ml). Kết quả phân tích hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm *in vitro* được trình bày ở bảng 2. Nhìn chung không có sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn giữa 3 loại cao chiết nhưng cao chiết ethanol 70% có hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm cao hơn so với 2 cao chiết còn lại. Do đó, chúng tôi chọn ethanol 70% là dung môi thích hợp để chiết xuất cao chiết tổng từ lá Nhàu.

Bảng 2. Hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của lá Nhàu khi được chiết bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau.

Mẫu	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)			Kháng viêm IC ₅₀ (μg/ml)
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	
MCL45	2,156±0,098	14,33±0,33	11,00±0,58	19,17±0,17	74,91
MCL70	3,152±0,041	16,33±0,88	9,50±0,50	20,50±0,29	62,98
MCL96	2,814±0,276	15,17±0,17	13,50±0,29	20,50±0,50	71,78
Amox	-	14,83±0,17	11,17±0,17	19,17±0,17	-
DS	-	-	-	-	168,81

Ghi chú: MCL45, MCL70 và MCL96 lần lượt là cao chiết ethanol 45, 70 và 96%; Amox là chứng dương Amoxicilin (50 μg/ml) đối với thực nghiệm kháng khuẩn; DS là chứng dương Diclofenac sodium đối với thực nghiệm kháng viêm.

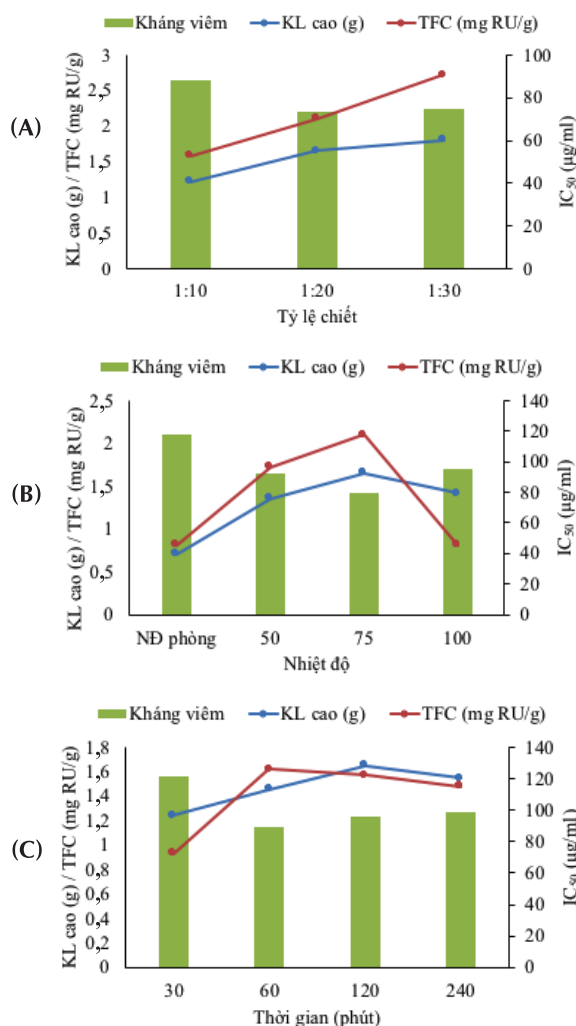
Tối ưu hoá điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu

Xác định miền khảo sát các yếu tố:

Nghiên cứu tiến hành khảo sát tiền tối ưu điều kiện chiết để xác định miền khảo sát của các thông số (nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ chiết) khi đưa dữ liệu đầu vào trên phần mềm với điều kiện chiết như sau: khối lượng nguyên liệu đem chiết là 5 g; nhiệt độ khảo sát là nhiệt độ phòng (25°C), 50, 75 và 100°C; thời gian chiết là 30, 60, 120 và 240 phút; tỷ lệ được liệu/dung môi khảo sát là 1/10, 1/20 và 1/30 (g/ml); nồng độ ethanol 70%.

Thông qua kết quả từ bảng 2 cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm có sự khác biệt

điển hình hơn so với hoạt tính kháng khuẩn. Do đó, nghiên cứu chọn hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm làm tiêu chí chính để khảo sát giai đoạn tiền tối ưu.



Hình 1. Khảo sát dự đoán miền tối ưu của tỷ lệ chiết (A), nhiệt độ chiết (B) và thời gian chiết (C).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tỷ lệ chiết tăng thì khối lượng cao chiết và hàm lượng flavonoid toàn phần tăng; hoạt tính kháng viêm tăng từ tỷ lệ chiết 1/10 đến 1/20 và không có sự khác biệt ở tỷ lệ 1/30 so với 1/20 (hình 1A). Điều này có thể lý giải là mặc dù khi tăng tỷ lệ chiết sẽ chiết được nhiều thành phần flavonoid hơn, nhưng có thể có những thành phần không thể hiện hoạt tính theo hướng kháng viêm. Khi nhiệt độ chiết tăng từ nhiệt độ phòng lên đến 75°C thì khối lượng cao chiết, hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm cũng tăng lên. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên đến 100°C thì cả 3 tiêu chí này đều giảm (hình 1B). Điều này có thể là do khi nhiệt độ tăng cao thì các hợp chất có hoạt tính kháng viêm bị phân hủy. Kết quả khảo sát thời gian chiết cho thấy, sau 30 phút chiết thì cả 3

tiêu chí đều cho kết quả thấp, có thể 30 phút chưa đủ để lấy hết các chất chiết được bao gồm cả những chất có hoạt tính kháng viêm trong dược liệu. Khối lượng cao chiết thu được tăng liên tục khi tăng thời gian chiết từ 30 đến 120 phút và giảm khi tăng thời gian lên gấp đôi (240 phút), tuy nhiên sự thay đổi này là không đáng kể. Hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm tăng từ 30 lên 60 phút chiết và có xu hướng giảm dần khi tăng thời gian chiết (hình 1C). Điều này có thể do chiết ở nhiệt độ cao trong thời gian dài có thể làm tác động bất lợi đến các hợp chất có hoạt tính kháng viêm.

Từ các khảo sát trên, chúng tôi chọn miền khảo sát các yếu tố như sau: tỷ lệ chiết là 1/10-1/30 (g/ml), nhiệt độ chiết là 50-100°C và thời gian chiết là 60-240 phút.

Ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm in vitro:

Bảng 3. Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của cao lá Nhàu.

Thí nghiệm thứ	Biến thực			Biến mã hoá			Hàm mục tiêu		
	X_1	X_2	X_3	U_1	U_2	U_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	60	205	500	-1	+1	+1	0,61±0,01	0,00±0,00	77,75
2	90	95	500	+1	-1	+1	2,46±0,12	13,50±0,50	57,81
3	90	95	300	+1	-1	-1	1,55±0,04	14,00±0,00	96,37
4	60	95	300	-1	-1	-1	3,58±0,12	20,00±0,00	76,13
5	90	205	300	+1	+1	-1	1,51±0,02	20,00±1,00	87,60
6	60	95	500	-1	-1	+1	2,58±0,04	21,50±1,50	83,54
7	90	205	500	+1	+1	+1	2,90±0,30	11,00±0,00	101,81
8	60	205	300	-1	+1	-1	2,34±0,07	10,50±0,00	103,75
9*	50	150	400	-2	0	0	1,68±0,04	10,00±0,00	93,10
10*	100	150	400	+2	0	0	0,72±0,03	16,00±0,00	96,26
11*	75	60	400	0	-2	0	1,68±0,05	0,00±0,00	89,92
12*	75	240	400	0	+2	0	1,46±0,02	15,00±0,00	98,60
13*	75	150	235	0	0	-2	1,57±0,14	14,00±0,00	85,23
14*	75	150	600	0	0	+2	2,72±0,12	22,50±0,50	75,11
15*	75	150	400	0	0	0	3,04±0,12	0,00±0,00	89,77
16*	75	150	400	0	0	0	2,11±0,12	18,50±1,50	87,96
17*	75	150	400	0	0	0	1,39±0,01	20,50±0,50	86,97
18*	75	150	400	0	0	0	2,25±0,07	21,50±3,50	103,90
19*	75	150	400	0	0	0	2,72±0,02	21,00±3,00	97,38
20*	75	150	400	0	0	0	2,09±0,09	15,00±0,00	73,87

Ghi chú: (*) thí nghiệm được tiến hành tại điểm sao; (°) thí nghiệm được tiến hành tại điểm tâm. Kháng khuẩn: cao chiết có nồng độ 100 mg/ml trên chủng *P. aeruginosa*.

Sau khi khảo sát các điều kiện chiết xuất được thiết kế trên phần mềm Design-Expert 11.0 và tiến hành thực nghiệm thu được kết quả như bảng 3. Từ kết quả bảng 3 có được phương trình hồi quy tương thích với thực nghiệm cho hàm lượng flavonoid toàn phần (1), hoạt tính kháng khuẩn (2) và kháng viêm (3) có dạng:

$$Y_1 = 2,05 - 0,1688X_1 - 0,2327X_2 + 0,1093X_3 + 0,4502X_1X_2 + 0,6289X_1X_3 - 0,0290X_2X_3 \quad (1)$$

$$Y_2 = 14,22 \quad (2)$$

$$Y_3 = 88,14 + 0,5663X_1 + 5,25X_2 - 4,39X_3 \quad (3)$$

Phương trình hồi quy (1) cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần chịu ảnh hưởng bậc 1 của cả 3 yếu tố nhiệt độ (X_1), thời gian (X_2), thể tích dung môi (X_3); không chịu ảnh hưởng bậc 2 của yếu tố nhưng đồng thời chịu ảnh hưởng của tương tác giữa 2 yếu tố. Cụ thể, trong 3 yếu tố khảo sát, 2 yếu tố X_1 và X_2 ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hàm bậc 1 với hệ số âm (-0,1688; -0,2327). Yếu tố X_3 ảnh hưởng đến hàm mục tiêu với hệ số dương của hàm bậc 1 là 0,1093. Hai yếu tố X_1X_2 tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hệ số dương (0,4502). Hai yếu tố X_1X_3 tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hệ số dương (0,6289); còn 2 yếu tố X_2X_3 tương tác với nhau có sự ảnh hưởng không đáng kể với hệ số âm là -0,0290.

Đối với hoạt tính kháng khuẩn theo phương trình (2) cho thấy, hoạt tính này không chịu sự ảnh hưởng bậc 1, 2 của các yếu tố X_1 , X_2 , X_3 , cũng như sự tương tác của chúng.

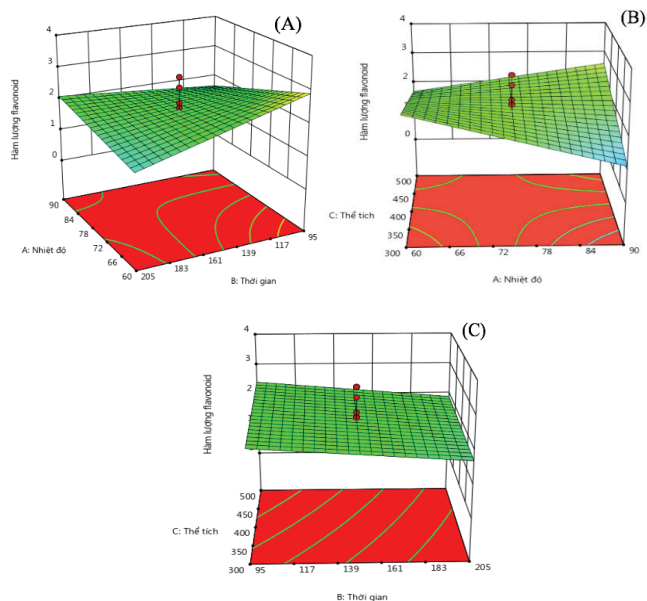
Đối với hoạt tính kháng viêm theo phương trình (3) cho thấy, hoạt tính này chỉ chịu ảnh hưởng bậc 1 của cả 3 yếu tố X_1 , X_2 , X_3 nhưng không chịu ảnh hưởng bậc 2 của 3 yếu tố X_1 , X_2 , X_3 đồng thời cũng không chịu ảnh hưởng của tương tác giữa chúng.

Theo mục tiêu nghiên cứu đặt ra, chọn các điều kiện phù hợp với hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm cao nhất. Kết quả giá trị tối ưu các điều kiện trong quá trình chiết xuất cao chiết từ lá Nhàu bằng RSM được thể hiện trong bảng 4.

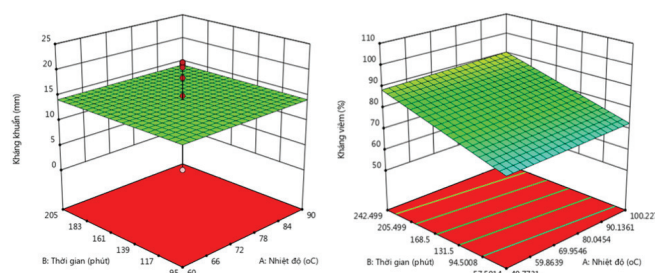
Bảng 4. Kết quả giá trị tối ưu hóa theo các yếu tố đáp ứng.

Yếu tố khảo sát	Yếu tố đáp ứng		
	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)
X_1 : nhiệt độ (°C)	60	75	90
X_2 : thời gian (phút)	95	150	95
X_3 : thể tích (ml)	300	600	500

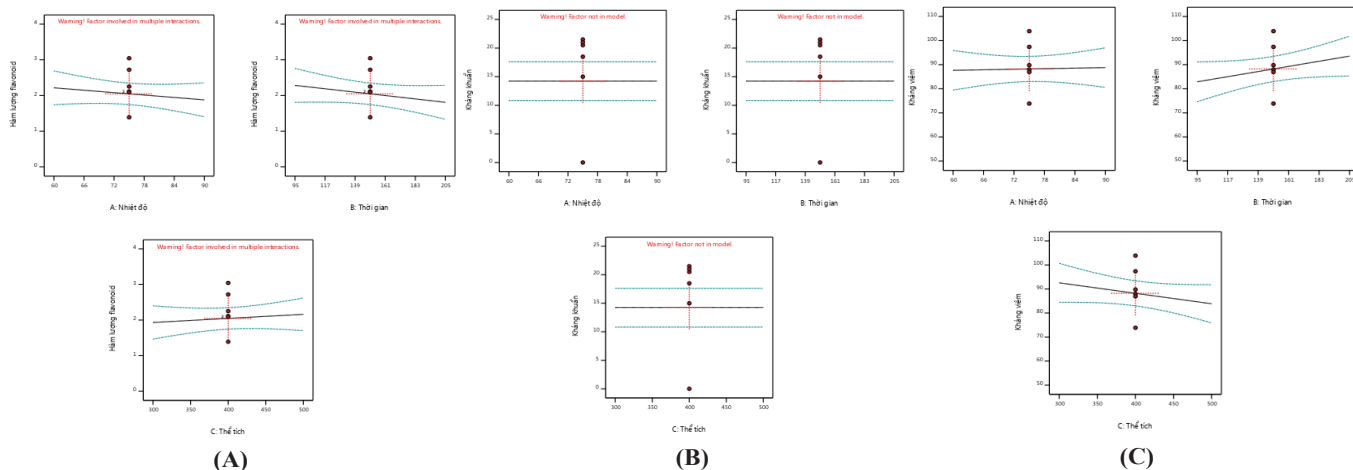
Từ kết quả hình 2 và 4A cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần có xu hướng giảm giá trị khi yếu tố nhiệt độ chiết X_1 và thời gian chiết X_2 thay đổi. Đối với yếu tố thể tích dung môi X_3 thì hàm lượng flavonoid toàn phần thể hiện xu hướng tăng trong vùng khảo sát. Từ kết quả hình 3B và 4C cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn có xu hướng tăng khi yếu tố X_2 thay đổi trong vùng khảo sát. Đối với yếu tố X_3 thì hoạt tính kháng khuẩn thể hiện xu hướng giảm. Từ hình 3A và 4B cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn không thay đổi khi các yếu tố thay đổi trong vùng khảo sát.



Hình 2. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của 2 yếu tố đến hàm lượng flavonoid toàn phần bao gồm thời gian và nhiệt độ (A); thể tích và nhiệt độ (B); thời gian và thể tích (C).



Hình 3. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của 2 yếu tố bao gồm thời gian và nhiệt độ đến hoạt tính kháng khuẩn (A) và kháng viêm (B).



Hình 4. Dự đoán sự thay đổi hàm lượng flavonoid toàn phần (A); hoạt tính kháng khuẩn (B) và hoạt tính kháng viêm (C) theo sự thay đổi của các yếu tố.

Từ các kết quả phân tích, các điều kiện chiết xuất được lựa chọn để chiết cao chiết tiềm năng từ lá Nhàu cho các khảo sát tiếp theo như sau: nhiệt độ chiết là 60°C; thời gian chiết là 95 phút; thể tích dung môi là 500 ml, tức tỷ lệ được liệu/dung môi là 1/25 (g/ml).

Đánh giá hiệu quả quá trình tối ưu hóa

Để kiểm tra tính tương thích của kết quả phương trình hồi quy từ phần mềm đối với thực nghiệm, tiến hành thực hiện lại quy trình chiết xuất với điều kiện tối ưu đã lựa chọn, thí nghiệm được thực hiện 3 lần và kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kiểm tra độ lặp lại của mô hình tối ưu hóa.

TT	X ₁ (°C)	X ₂ (phút)	X ₃ (ml)	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)	IC ₅₀ (μg/ml)
1	60	95	500	2,105	11,00	70,21
2	60	95	500	2,391	12,00	70,20
3	60	95	500	2,184	11,50	70,21
Trung bình				2,227±0,085	11,50±0,29	70,21±0,003

Sai số hàm lượng flavonoid toàn phần giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|2,227 - 2,41|}{2,41} \times 100\% = 7,5\%$$

Sai số hoạt tính kháng khuẩn giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|11,5 - 14,225|}{14,225} \times 100\% = 19,156\%$$

Sai số hoạt tính kháng viêm giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

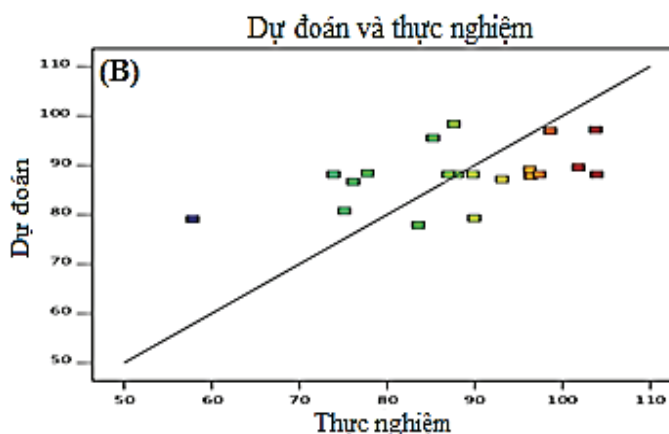
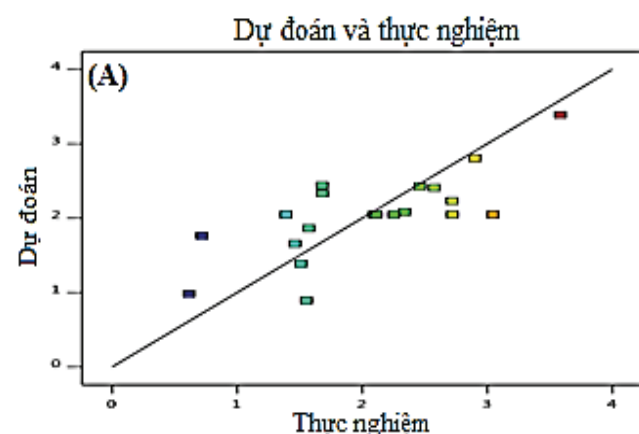
$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|70,206 - 77,94|}{77,94} \times 100\% = 9,9\%$$

Tính toán kết quả sai số trung bình sau 3 lần thực hiện thí nghiệm của hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm cho thấy, sai số thấp và mô hình tối ưu có độ lặp lại tốt.

Sau khi đưa ra kết quả về hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của 20 thí nghiệm thực nghiệm vào phần mềm Design-Expert 11.0, thu được kết quả phân tích phương sai và giá trị các hệ số của mô hình như bảng 6 và hình 5.

Bảng 6. Phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố chiết đến hàm mục tiêu Y_1 (hàm lượng flavonoid toàn phần) và Y_3 (hoạt tính kháng viêm).

Hàm mục tiêu	Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Y_1	X_1	0,389	1	0,389	0,99	0,338
	X_2	0,739	1	0,739	1,88	0,193
	X_3	0,163	1	0,163	0,42	0,531
	X_1X_2	1,620	1	1,620	4,13	0,063
	X_1X_3	3,160	1	3,160	8,05	0,014
	X_2X_3	0,007	1	0,007	0,02	0,898
	Tổng sai số	11,19	19			
	$CV=30,60\%, R^2=0,544$					
Y_3	X_1	4,38	1	4,38	0,036	0,853
	X_2	375,90	1	375,90	3,050	0,100
	X_3	263,11	1	263,11	2,140	0,163
	Tổng sai số	2614,28	19			
	$CV=12,59\%, R^2=0,246$					



Hình 5. So sánh hàm lượng flavonoid toàn phần (A) và hoạt tính kháng viêm (B) từ thực nghiệm và từ mô hình được xây dựng.

Đối với hàm mục tiêu Y_1 ; kết quả cho thấy, các biến đơn X_1, X_2, X_3 không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p>0,05$), nhưng tương tác bậc hai (X_1X_3) của biến này có ảnh hưởng đáng kể nên biến X_1, X_3 được giữ lại để phân tích tối ưu. Riêng biến đơn X_2 không có ảnh hưởng đáng kể nên không được giữ lại phân tích tối ưu sau này. Kết quả phân tích cho thấy, các yếu tố tương tác với hàm mục

tiêu hàm lượng flavonoid toàn phần với giá trị mức ý nghĩa $R^2=0,544$ và độ tin cậy là 74%. Hệ số xác định R (coefficient of determination) cho biết 54,4% sự biến đổi của hàm lượng flavonoid toàn phần là do ảnh hưởng của các biến độc lập như hàm nhiệt độ, thời gian chiết và thể tích dung môi, có 45,6% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Bên cạnh đó, hệ số biến thiên CV (coefficient of variation) cao chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại thấp. Giá trị p của kiểm định sự không tương thích của mô hình là 0,393, lớn hơn 0,05. Như vậy, sự khác biệt giữa dự đoán của phần mềm và thực nghiệm không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$. Do đó, mô hình hồi quy trên tương thích với thực nghiệm.

Đối với hàm mục tiêu Y_3 ; kết quả cho thấy, các biến đơn X_1, X_2, X_3 không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p>0,05$) nên không được giữ lại để phân tích tối ưu sau này. Kết quả phân tích cho thấy, các yếu tố tương tác với hàm mục tiêu hoạt tính kháng viêm với giá trị mức ý nghĩa $R^2=0,246$ và độ tin cậy là 49,6%. Hệ số xác định R cho biết 24,6% sự biến đổi của hoạt tính kháng viêm là do ảnh hưởng của các biến độc lập như hàm nhiệt độ, thời gian chiết và thể tích dung môi, có 75,4% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Bên cạnh đó, hệ số biến thiên CV cao chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại thấp. Giá trị p của kiểm định sự không tương thích của mô hình là 0,422, lớn hơn 0,05. Như vậy, sự khác biệt giữa dự đoán của phần mềm và thực

nghiệm không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$. Do đó, mô hình hồi quy trên tương thích với thực nghiệm.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của 3 nhân tố chiết (nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ được liệu/dung môi) đến hàm lượng flavonoid toàn phần,

hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm từ lá Nhàu. Kết hợp giữa phương pháp truyền thống và sự hỗ trợ của phần mềm thu được các giá trị tối ưu để chiết cao lá Nhàu như sau: dung môi chiết ethanol 70%, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 95 phút và tỷ lệ dược liệu/dung môi 1/25 (g/ml). Cao chiết tại điều kiện chiết này có hàm lượng flavonoid toàn phần là 2,227 mg RU/g chất khô, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với ĐKV kháng khuẩn là 11,5 mm ở nồng độ 100 mg/ml đối với chủng *P. aeruginosa*, hoạt tính kháng viêm với giá trị IC_{50} là 70,21 μ g/ml. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, việc áp dụng phương pháp truyền thống với sự hỗ trợ của phần mềm thông minh trong quy trình chiết xuất giúp giảm chi phí, công sức và rút ngắn thời gian nghiên cứu. Đây là bước đầu thành công để tạo ra cao chiết tiềm năng từ lá Nhàu cho các nghiên cứu và ứng dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Viện Dược liệu (2007), *Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, **Tập II**, tr.443-446.
- [2] R.A. Assi, et al. (2017), “*Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials”, *Arabian Journal of Chemistry*, **10(5)**, pp.691-707.
- [3] M.R. Serafini, et al. (2011), “*Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration”, *Journal of Medicinal Food*, **14(10)**, pp.1159-1166.
- [4] H. Gu, et al. (2018), “*Morinda citrifolia* Leaf Extract Enhances Osteogenic Differentiation Through Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling”, *Journal of Medicinal Food*, **21(1)**, pp.57-69.
- [5] M.A. Bezerra, et al. (2008), “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry”, *Talanta*, **76(5)**, pp.965-977.
- [6] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay (2010), “Response surface methodology”, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, **2(2)**, pp.128-149.
- [7] X. Zhang, et al. (2017), “Optimization of Extract Method for *Cynomorium songaricum* Rupr. by Response Surface Methodology”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2017**, Article ID 6153802, pp.1-7.
- [8] H. Long, et al. (2017), “Optimization of monomethoxy polyethyleneglycol-modified oxalate decarboxylase by response surface methodology”, *Journal of Biological Physics*, **43(3)**, pp.445-459.
- [9] Thao T. Nguyen, Marie-Odile Parat, Mark P. Hodson, Jenny Pan, Paul N. Shaw, Amitha K. Hewavitharana (2016), “Chemical Characterization and *in vitro* Cytotoxicity on Squamous Cell Carcinoma Cells of *Carica Papaya* Leaf Extracts”, *Toxins*, **8(1)**, p.7.
- [10] Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Mai Trúc Tiên (2018), “Nghiên cứu thực nghiệm tác dụng kháng khuẩn, trị ho và long đờm của cao chiết cồn từ lá Tía tô”, *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **22(5)**, tr.34-39.
- [11] F. Alhakmani, S. Kumar, S.A. Khan (2013), “Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*”, *Asian Pacific Journal of*