

## TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT CÁC HỢP CHẤT POLYPHENOL CÓ TÍNH CHỐNG OXI HÓA CAO TỪ CÂY SIM (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk.) THU THẬP Ở VÙNG ĐỒI NÚI CHÍ LINH, HẢI DƯƠNG

Hoàng Thị Yến<sup>1</sup>, Trịnh Thị Thùy Linh<sup>1</sup>, Mai Chí Thành<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Thu Huyền<sup>2</sup>, Lại Thị Ngọc Hà<sup>3</sup>, Bùi Văn Ngọc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*bui@ibt.ac.vn

<sup>2</sup>Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**TÓM TẮT:** Cây sim, *Rhodomyrtus tomentosa*, từ lâu đã được sử dụng trong sản xuất đồ uống có cồn, mỹ phẩm, thuốc chữa bệnh. Đặc biệt, lá và thân cây chứa lượng lớn các hợp chất polyphenol có tính chống oxy hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tối ưu việc thu nhận các hợp chất polyphenol có tính chống oxy hóa từ cây sim bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Trong các bộ phận của cây sim, lá có hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa cao nhất khoảng 104,16±26,2 mg đương lượng acid gallic/g chất khô (Gallic Acid Equivalent/g Dry Weight - GAE/g DW) và 1026,89±161,5 μM đương lượng Trolox/g chất khô (Trolox Equivalent/g Dry Weight - TE/g DW). Ngoài ra, 3 yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của dịch chiết là nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian chiết. Bằng việc áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology) và bố trí 21 thí nghiệm theo thiết kế cấu trúc có tâm (Central Composite Design) với 3 lần lặp lại tại giá trị trung tâm, chúng tôi xây dựng được mô hình mô tả việc tách chiết các hợp chất polyphenol có tính chống oxy hóa với hàm mục tiêu là khả năng chống oxy hóa của dịch chiết (Y) và 3 yếu tố ảnh hưởng là nồng độ ethanol (X<sub>1</sub>), nhiệt độ (X<sub>2</sub>) và thời gian (X<sub>3</sub>) như sau:  $Y = 3093,856 + 20,488X_1 - 55,106X_2 - 13,332X_3 - 0,13X_1^2 + 0,256 X_2^2 - 0,054X_3^2 - 0,146X_1X_2 - 0,020X_1X_3 + 0,297X_2X_3$ . Mô hình thu được tương thích khá cao với kết quả thu được thực nghiệm ( $R^2 = 0,941$ ). Theo mô hình, điều kiện tối ưu hóa cho dịch chiết có khả năng chống oxy hóa cao nhất là ethanol 65%, nhiệt độ 45°C, thời gian 30 phút. Trong điều kiện này, dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol tổng số là 76,42 mg GAE/g DW và khả năng chống oxy hóa là 1408,99 μM TE/g DW. Mô hình được kiểm tra lại bằng cách tiến hành tách chiết lặp lại 4 lần các hợp chất polyphenol của lá sim tại điều kiện tối ưu. Kết quả thực nghiệm thu được không sai khác so với kết quả tính toán được từ mô hình ( $p < 0,05$ ).

**Từ khóa:** Cây sim, hàm lượng polyphenol tổng số, khả năng chống oxy hóa, phương pháp đáp ứng bề mặt, mô hình hóa, điều kiện tối ưu hóa.

### MỞ ĐẦU

Sim, *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk, là một loại thực vật có hoa thuộc họ Myrtaceae và có nguồn gốc ở khu vực Nam và Đông Nam Á [15]. Ở một số nước trên thế giới như Thái Lan, Malaysia, Ấn Độ và Trung Quốc... người ta đã chiết xuất các hợp chất có trong các bộ phận khác nhau của cây sim để sử dụng làm thuốc chữa bệnh (đau tim, đau bụng, bệnh lý, xuất huyết, thuốc giảm đau và cầm máu) [1, 5, 14, 22]; sản xuất mứt, rượu và các đồ uống chứa cồn [11, 23]; sản xuất mỹ phẩm làm trắng và đẹp da, chống lão hóa [12, 13]. Phân tích thành phần hóa học của cây sim cho thấy ngoài các

sản phẩm trao đổi chất sơ cấp như carbohydrates, aminoacids, proteins và chlorophylls, cây sim còn chứa một số các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp như alkaloids, saponins, steroids, flavonoids và tannins [8]. Ngoài ra, những nghiên cứu gần đây đã phát hiện trong lá và thân cây sim còn chứa một số chất kháng sinh (rhodomyrtone) có tác dụng kháng lại một số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* [4, 10, 15, 21].

Ở Việt Nam, sim đã được sử dụng từ lâu

trong dân gian để làm thuốc chữa bệnh, làm kẹo dẻo và làm rượu bổ [20]. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu về cây sim cũng như ứng dụng của nó trong lĩnh vực bảo quản thực phẩm và dược phẩm chưa nhiều. Thực tế, mới chỉ có một số công trình nghiên cứu về hóa thực vật cây sim [6]; tách và xác định cấu trúc một số hợp chất từ hoa cây sim [9, 7] về xác định hàm lượng các hợp chất polyphenol, khả năng kháng oxy hóa của quả sim và mô hình hóa quá trình tách chiết polyphenol từ quả sim thu hái tại Hòa Bình. Tuy nhiên, trong nghiên cứu gần đây, Lại Thị Ngọc Hà và nnk. (2012) [7] đã tập trung khai thác các hợp chất polyphenol kháng oxy hóa từ quả sim mà chưa quan tâm đến các bộ phận khác của cây như lá và búp. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng kháng oxy hóa trong các bộ phận như lá, búp và quả của cây sim thu hái ở vùng đồi núi thuộc Chí Linh, Hải Dương. Tiếp theo, từ kết quả khảo sát này, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa điều kiện tách chiết các hợp chất polyphenol có tính chống oxy hóa cao từ một bộ phận tiềm năng chứa hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa cao nhất của cây sim.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cành sim được thu hái ở vùng đồi núi thuộc Côn Sơn, phường Cộng Hòa, thị xã Chí Linh, tỉnh Hải Dương và được tách riêng lá, búp và quả. Sau đó, vật liệu này được rửa sạch, để ráo nước, đông khô ở nhiệt độ  $-50^{\circ}\text{C}$  trong 2 ngày (đối với lá và búp) và 5 ngày (đối với quả). Tiếp theo, chúng được nghiền nhỏ (0,3 mm) và được lưu trữ trong tủ lạnh đông ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Phương pháp tách chiết các hợp chất polyphenol kháng oxy hóa: 0,5 g mẫu/10 mL dung môi (acetone:  $\text{H}_2\text{O}$ : acetic acid tỷ lệ 70:29:1 (v:v:v)), chiết ở nhiệt độ  $40^{\circ}\text{C}$ , thời gian 60 phút, lắc mẫu trong suốt quá trình chiết. Khi kết thúc quá trình, ly tâm hỗn hợp ở  $4^{\circ}\text{C}$ , tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút.

Trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ đến khả năng tách chiết các hợp chất polyphenol, mẫu được chiết với các nồng độ dung môi ethanol khác nhau, theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau, theo

nhiệt độ và thời gian tách chiết khác nhau. Các thí nghiệm sau kế thừa các kết quả của các thí nghiệm trước. Lắc mẫu trong suốt quá trình chiết. Khi quá trình chiết kết thúc, ly tâm hỗn hợp ở  $4^{\circ}\text{C}$  với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 10 phút, dịch trong thu được là dịch chiết polyphenol.

Hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [17]. Gallic acid được dùng làm chất chuẩn. Hàm lượng polyphenol tổng số được biểu diễn theo mg đương lượng gallic acid (Gallic Acid Equivalent - GAE) trên 1 g chất khô (Dry Weight - DW) hay mg GAE/g DW.

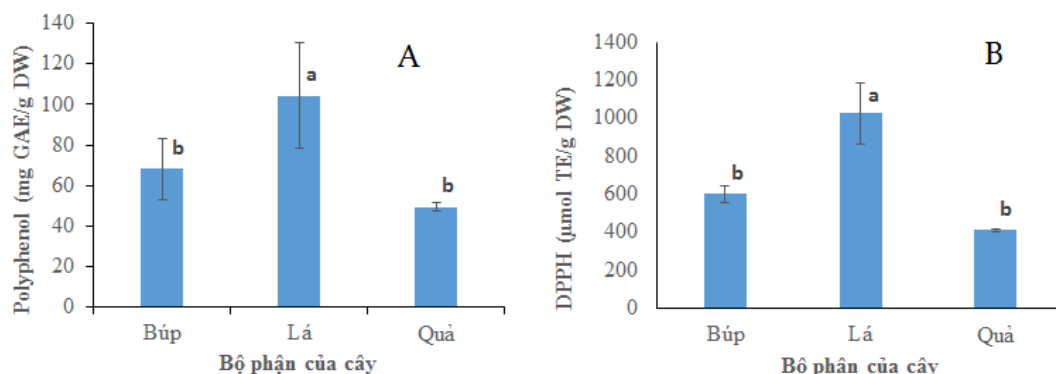
Khả năng chống oxy hóa được xác định bằng phương pháp DPPH [19]. Trolox được dùng làm chất chuẩn. Do đó, khả năng kháng oxy hóa được biểu diễn theo  $\mu\text{mol}$  đương lượng Trolox (Trolox Equivalent -TE) trên 1 g chất khô (Dry Weight - DW) hay  $\mu\text{M TE/g DW}$ .

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả biểu diễn ở dạng  $\text{TB}\pm\text{SD}$ . Phần mềm SAS 9.0 được dùng để phân tích số liệu. Phân tích ANOVA một yếu tố được dùng để so sánh các trung bình. Test Duncan được sử dụng. Thí nghiệm mô hình hóa và tối ưu hóa được thiết kế theo Rotatable Central Composite Design bằng phần mềm JMP10.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của các bộ phận khác nhau của cây sim

Theo Boeing et al. (2014) [2], khi sử dụng hỗn hợp 3 dung môi acetone/nước/acid acetic với tỷ lệ thành phần khác nhau đem lại hiệu quả tách chiết cao. Đây cũng là hỗn hợp dung môi được Wu và cộng sự dùng để tách chiết và phân tích xây dựng dữ liệu về hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng kháng oxy hóa của các loại rau quả [24]. Vì vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng hỗn hợp dung môi là acetone: $\text{H}_2\text{O}$ :acetic acid với tỷ lệ: 70:29:1 (v:v:v) để tiến hành xác định hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa. Kết quả xác định được trình bày ở hình 1.



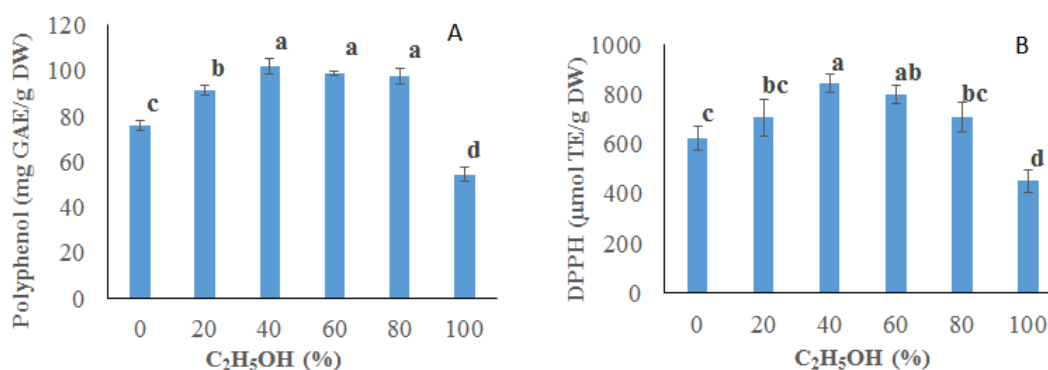
Hình 1. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxy hóa (B) của 3 bộ phận khác nhau của cây sim. Trong cùng một cột, số liệu mang những chữ cái khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa  $\alpha=0,05$ .

Hình 1 cho thấy, trong 3 bộ phận khác nhau của cây sim, lá có hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa cao nhất. Hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa cao hơn tương ứng khoảng 2,1 lần và 2,6 lần so với quả và khoảng 1,5 lần và 1,7 lần so với búp. Từ cây sim, lá có khối lượng nhiều nhất và có thể thu hái quanh năm. Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn lá để sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

#### Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết các hợp chất polyphenol từ lá sim

#### Ảnh hưởng của nồng độ ethanol

Trên thế giới người ta đã sử dụng aceton, ethylacetate, ethanol, methanol và hỗn hợp methanol để tách chiết polyphenol. Tuy nhiên, để ứng dụng trong bảo quản và chế biến thực phẩm ethanol lại thường được sử dụng vì đây là loại dung môi an toàn [16, 18]. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng dung môi là ethanol với nồng độ khác nhau: 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, và 100% (v/v). Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/20, nhiệt độ chiết ở 40°C và thời gian chiết trong 60 phút. Kết quả phân tích hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxy hóa (DPPH) (B) của lá sim khi được chiết bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau

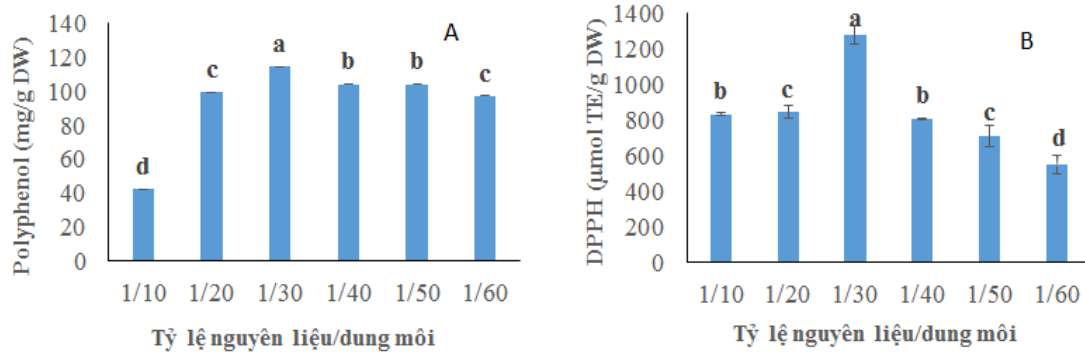
Hình 2 cho thấy, nồng độ dung môi ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa của lá sim ( $p < 0,0001$ ). Khi chiết ở nồng độ ethanol 40%, hàm

lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa đạt cao nhất (polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa cao gần gấp đôi so với khi chiết ở nồng độ 100%). Tuy nhiên, khi tăng

nồng độ ethanol từ 40% lên 60% hoặc 80%, hàm lượng polyphenol tổng số cũng không thay đổi (hình 2A). Từ đó, chúng tôi đã lựa chọn nồng độ ethanol 40% cho các nghiên cứu tiếp theo và chọn nồng độ ethanol 50% làm giá trị trung tâm và khoảng biến đổi 25% để đưa vào thí nghiệm mô hình hóa.

#### Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành tách chiết polyphenol tổng số từ lá sim với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 và 1/60 ở nhiệt độ 40°C, nồng độ ethanol 40% và thời gian tách chiết 60 phút. Kết quả được trình bày hình 3.

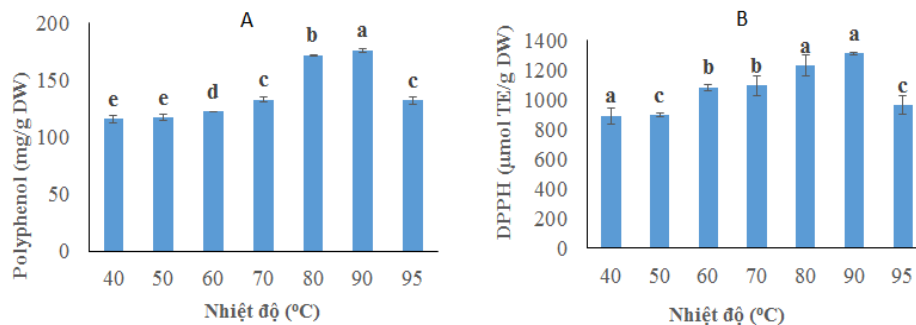


Hình 3. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxy hóa (B) của lá sim khi được chiết với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau

Hình 3 cho thấy, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa ( $p < 0,0001$ ). Ở đây, công thức chiết mẫu với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 cho kết quả hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxy hóa cao nhất. Khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi giảm (1/40 đến 1/60) hay phần trăm dung môi tăng, thì hàm lượng polyphenol tổng số và khả

năng chống oxy hóa không tăng mà có xu hướng giảm ( $p < 0,0001$ ). Ngoài ra, hàm lượng polyphenol tổng số biến đổi không nhiều khi tỷ lệ nguyên liệu/dung môi thay đổi. Vì vậy, trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi không đưa tỷ lệ nguyên liệu/dung môi vào mô hình hóa và chọn tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 cho những nghiên cứu tiếp theo.

#### Ảnh hưởng của nhiệt độ



Hình 4. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxy hóa của lá sim (B) khi được chiết ở các khoảng nhiệt độ khác nhau

Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của

lá sim. Chúng tôi tiến hành chiết polyphenol của lá sim ở các nhiệt độ 40°C; 50°C; 60°C; 70°C; 80°C; 90°C và 95°C với ethanol 40%, tỷ lệ

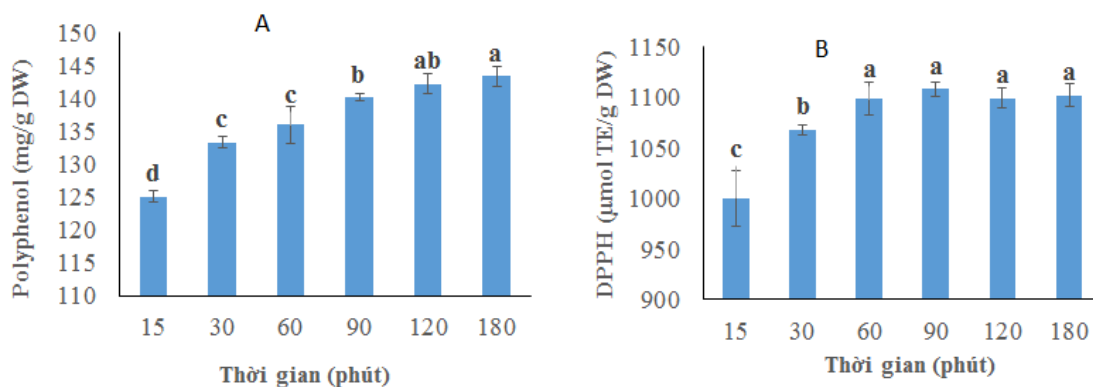
nguyên liệu/dung môi 1/30 và thời gian chiết 60 phút. Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.0 cho thấy kết quả nhiệt độ ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa trong quá trình tách chiết lá sim ( $p < 0,0001$ ). Hình 4 cho thấy, khi chiết ở nhiệt độ 90°C, hàm lượng polyphenol tổng số đạt cao nhất ( $176,26 \pm 1,59$  mg GAE/g DW) và khả năng chống oxi hóa cũng đạt cực đại ở khoảng nhiệt độ này ( $1307,8 \pm 10,81$   $\mu$ M TE/gDW). Kết quả này chứng tỏ polyphenol chiết từ lá sim là hợp chất rất bền nhiệt. Đây là tính chất quan trọng của polyphenol lá sim, giúp tăng tiềm năng ứng dụng polyphenol lá sim trong công nghiệp thực phẩm mà tại đó các quá trình gia nhiệt xảy ra thường xuyên. Tuy nhiên, việc chiết ở nhiệt độ cao sẽ làm tăng chi phí sản xuất và có thể giảm chất lượng sản phẩm do sự hình thành những hợp chất không mong muốn. Hình 4 cho thấy khi chiết ở khoảng nhiệt độ 60-70°C, hàm lượng

polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa khá cao (khoảng 80% so với chiết ở nhiệt độ 90°C). Vì vậy, trong thí nghiệm tiếp theo chúng tôi chọn 2 điều kiện nhiệt độ chiết là 65°C và 90°C để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian tới quá trình tách chiết polyphenol từ lá sim và chúng tôi chọn nhiệt độ 65°C làm giá trị trung tâm và khoảng biến đổi là 20 để đưa vào mô hình.

#### Ảnh hưởng của thời gian

Trong thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian, chúng tôi đã sử dụng ethanol ở nồng độ 40%, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/30, nhiệt độ tách chiết 65°C và 90°C và chiết ở điều kiện thời gian như sau: 15; 30; 60; 90; 120 và 180 phút (đối với nhiệt độ 65°C) và 5; 15; 30; 45; 60; 90 phút (đối với nhiệt độ 90°C). Kết quả xác định ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa khi chiết ở nhiệt độ 65°C được trình bày ở hình 5.

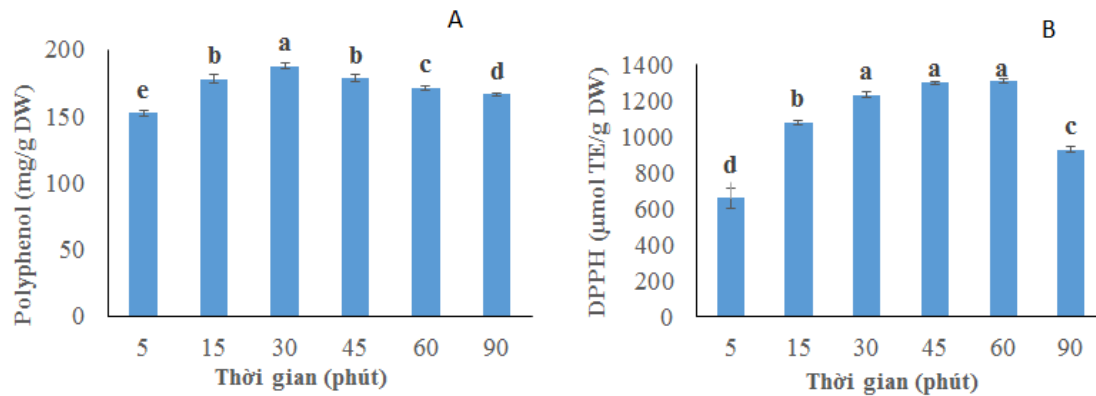


Hình 5. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxi hóa (B) của lá sim khi được chiết ở nhiệt độ 65°C với các khoảng thời gian khác nhau.

Kết quả xử lý số liệu bằng phần mềm SAS 9.0 cho thấy, yếu tố thời gian ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa ( $p < 0,0001$ ). Hình 5 cho thấy, động thái biến đổi theo thời gian của hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa chia làm hai pha. Pha đầu là khoảng thời gian từ 0-60 phút. Trong khoảng thời gian này có sự tăng lên nhanh chóng của cả hai chỉ tiêu (hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa). Pha thứ hai là khoảng thời gian từ 60

đến 180 phút. Từ phút 60 đến phút thứ 180 hàm lượng polyphenol tổng số tăng nhẹ, tuy nhiên khả năng chống oxi hóa hầu như không thay đổi về mặt thống kê (hình 5).

Khi chiết lá ở nhiệt độ 90°C, hàm lượng polyphenol tổng số đạt cực đại ở khoảng thời gian 30 phút ( $187,54 \pm 2,25$  mg GAE/g DW) và khả năng chống oxi hóa đạt cực đại ở khoảng 45 phút ( $1296,44 \pm 9,78$   $\mu$ M TE/gDW). Khi thời gian chiết càng tăng lên, cả hai chỉ tiêu này đều giảm (hình 6).



Hình 6. Hàm lượng polyphenol tổng số (A) và khả năng chống oxi hóa (B) của lá sim khi được chiết ở nhiệt độ 90°C ở các khoảng thời gian khác nhau

Như vậy, so sánh hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa khi chiết lá ở nhiệt độ 65°C và 90°C cho thấy khi chiết ở nhiệt độ thấp cần thời gian chiết dài (khoảng 60-70 phút) còn khi chiết ở nhiệt độ cao 90°C cần thời gian ngắn hơn (khoảng 30 phút). So sánh hiệu suất tách chiết ở hai khoảng nhiệt độ này cho thấy, chiết ở nhiệt độ thấp 65°C cho hiệu suất thấp hơn (khoảng 75%) so với chiết ở nhiệt độ 90°C.

Từ các kết quả trên chúng tôi nhận thấy để bảo đảm mô hình mô tả đầy đủ cả hai giai đoạn chiết nhanh và chiết chậm các hợp chất polyphenol từ lá sim nên chọn giá trị trung tâm cho khoảng thời gian chiết 70 phút và khoảng biến đổi 40 phút.

#### Mô hình hóa quá trình tách chiết

Trong 4 yếu tố khảo sát ở phần trên, chúng

tôi nhận thấy cả 4 yếu tố là nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian đều ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa. Tuy nhiên, trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi chỉ công bố kết quả mô hình hóa 3 yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến hàm mục tiêu Y (hàm lượng polyphenol tổng số hoặc khả năng chống oxi hóa) thu được từ 1g chất khô (mg GAE/g DW). Mô hình có dạng:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}(X_1X_2) + b_{13}(X_1X_3) + b_{23}(X_2X_3)$$

Trong đó,  $X_1$  là nồng độ ethanol (% v/v);  $X_2$  là nhiệt độ chiết (°C);  $X_3$  là thời gian chiết (phút).

Với các mức thí nghiệm được giới thiệu trong bảng 1.

Bảng 1. Các mức thí nghiệm sử dụng trong mô hình

| Mức thí nghiệm  | Nồng độ ethanol (% V/V) | Nhiệt độ chiết (°C) | Thời gian chiết (phút) |
|-----------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| Mức gốc         | 50                      | 65                  | 70                     |
| Khoảng biến đổi | 25                      | 20                  | 40                     |
| Mức trên        | 75                      | 85                  | 110                    |
| Mức dưới        | 25                      | 45                  | 30                     |

Với các mức thí nghiệm như trên, chúng tôi đã xây dựng được bảng ma trận thực nghiệm. Tiến hành thí nghiệm theo bảng ma trận thực nghiệm, xác định hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa ở các điều kiện khác nhau, chúng tôi thu được bảng 2.

Dựa vào kết quả của bảng 2 và sử dụng phần mềm JPM10, chúng tôi tiến hành mô hình hóa theo hàm lượng polyphenol tổng số. Tuy nhiên, kết quả cho thấy phương trình của hàm theo hàm lượng polyphenol tổng số thu được là hàm tuyến tính nên không xác định được điểm

tối ưu. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xác định polyphenol tổng số thu được trong cùng điều kiện tách chiết. điểm tối ưu theo hàm mục tiêu là khả năng chống oxi hóa từ đó suy ra hàm lượng

**Bảng 2.** Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả xác định hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa của lá sim

| S<br>TT | Thí<br>nghiệm | Biến chuẩn |       |       | Biến thực                        |                  |                        | Hàm<br>lượng<br>polypheno<br>l tổng số<br>(mg GAE/g<br>CK) | Khả năng<br>chống oxi<br>hóa (μmol<br>TE/g CK) |
|---------|---------------|------------|-------|-------|----------------------------------|------------------|------------------------|--|--|
|         |               | X1         | X2    | X3    | Nồng<br>độ<br>ethanol<br>(% v/v) | Nhiệt độ<br>(°C) | Thời<br>gian<br>(phút) |  |  |
| 1       | 1A            | 1          | 1     | 1     | 75                               | 85               | 110                    | 185,70   | 660,07   |
| 2       | 1B            | 1          | 1     | 1     | 75                               | 85               | 110                    | 183,38   | 659,11   |
| 3       | 1C            | 1          | 1     | 1     | 75                               | 85               | 110                    | 186,66   | 677,36   |
| 4       | 2             | -1         | 1     | 1     | 25                               | 85               | 110                    | 178,62   | 1112,38  |
| 5       | 3             | 1          | -1    | 1     | 75                               | 45               | 110                    | 132,99   | 642,19   |
| 6       | 4             | -1         | -1    | 1     | 25                               | 45               | 110                    | 125,04   | 600,34   |
| 7       | 5             | 1          | 1     | -1    | 75                               | 85               | 30                     | 133,23   | 568,91   |
| 8       | 6             | -1         | 1     | -1    | 25                               | 85               | 30                     | 99,92  | 753,02   |
| 9       | 7             | 1          | -1    | -1    | 75                               | 45               | 30                     | 60,42  | 1299,02  |
| 10      | 8A            | -1         | -1    | -1    | 25                               | 45               | 30                     | 70,81  | 1353,56  |
| 11      | 8B            | -1         | -1    | -1    | 25                               | 45               | 30                     | 69,49  | 1362,91  |
| 12      | 8C            | -1         | -1    | -1    | 25                               | 45               | 30                     | 70,64  | 1342,35  |
| 13      | 9             | 1,68       | 0     | 0     | 92                               | 65               | 70                     | 132,65   | 528,05   |
| 14      | 10            | -1,68      | 0     | 0     | 8                                | 65               | 70                     | 36,96  | 770,61   |
| 15      | 11            | 0          | 1,68  | 0     | 50                               | 98,6             | 70                     | 147,85   | 736,39   |
| 16      | 12            | 0          | -1,68 | 0     | 50                               | 31,4             | 70                     | 98,69  | 1601,18  |
| 17      | 13            | 0          | 0     | 1,68  | 50                               | 65               | 137,2                  | 136,99   | 532,39   |
| 18      | 14            | 0          | 0     | -1,68 | 50                               | 65               | 2,8                    | 83,81  | 736,61   |
| 19      | 15A           | 0          | 0     | 0     | 50                               | 65               | 70                     | 86,95  | 917,17   |
| 20      | 15B           | 0          | 0     | 0     | 50                               | 65               | 70                     | 87,33  | 924,16   |
| 21      | 15C           | 0          | 0     | 0     | 50                               | 65               | 70                     | 87,94  | 922,58   |

Sau khi đưa ma trận kết quả về khả năng chống oxi hóa của 21 thí nghiệm thực nghiệm vào phần mềm JPM10, chúng tôi thu được kết quả phân tích phương sai và giá trị các hệ số của mô hình trong bảng 3 và 4 dưới đây.

**Bảng 3.** Phân tích phương sai của mô hình đáp ứng bề mặt khả năng chống oxi hóa của hợp chất polyphenol từ lá sim

| Nguồn biến thiên            | Bậc tự do | Tổng bình<br>phương | Giá trị trung bình<br>bình phương | Kiểm định<br>tỷ số F |
|-----------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Mô hình                     | 9         | 1983247,8           | 220361                            | 19,5115              |
| Sai số                      | 11        | 124233,1            | 11294                             | Prob>F               |
| Tính phù hợp của mô<br>hình | 5         | 123783,33           | 24756,7                           | 330,2472             |
| Tổng số                     | 20        | 2107480,9           |                                   | <0,001*              |

\*. mức ý nghĩa  $\alpha=0,05$ .

Bảng 4. Ước lượng tham số mô hình dự đoán sự ảnh hưởng của các biến đến hàm mục tiêu

| Hệ số                                  | Giá trị   | Độ lệch chuẩn | Tỷ số t | Prob> t  |
|--|-----------|---------------|---------|----------|
| Hệ số tự do (b <sub>0</sub> )          | 916,95097 | 61,22805      | 14,98   | <0,0001* |
| EtOH(25,75) (b <sub>1</sub> )          | -78,06457 | 26,42062      | -2,95   | 0,0131*  |
| Nhietdo(45,85) (b <sub>2</sub> )       | -165,7921 | 26,42062      | -6,28   | <0,0001* |
| Thoigian(30,110) (b <sub>3</sub> )     | -96,07312 | 26,42062      | -3,64   | 0,0039*  |
| EtOH - Nhietdo (b <sub>12</sub> )      | -72,87896 | 34,05457      | -2,14   | 0,0556   |
| EtOH - Thoigian (b <sub>23</sub> )     | -16,38896 | 34,05457      | -0,48   | 0,6398   |
| Nhietdo - Thoigian (b <sub>34</sub> )  | 237,65854 | 34,05457      | 6,98    | <0,0001* |
| EtOH - EtOH (b <sub>11</sub> )         | -81,16518 | 31,45469      | -2,58   | 0,0256*  |
| Nhietdo - Nhietdo (b <sub>22</sub> )   | 102,48989 | 31,45469      | 3,26    | 0,0076*  |
| Thoigian - Thoigian (b <sub>33</sub> ) | -86,40838 | 31,45469      | -2,75   | 0,0190*  |

\*. mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ .

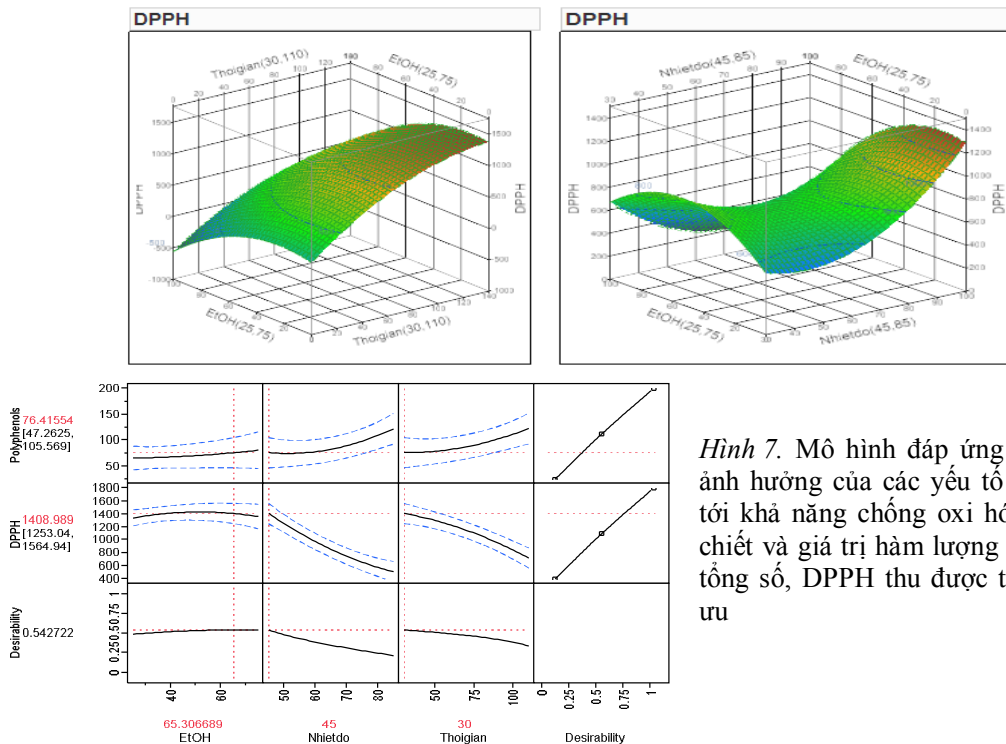
Từ các hệ số của mô hình (bảng 4), mô hình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ (nồng độ ethanol, nhiệt độ, thời gian) đến khả năng chống oxy hóa được biểu diễn như sau:

$$Y = 916,95 - 78,06 X_1^S - 165,79 X_2^S - 96,07 X_3^S - 81,17(X_1^S)^2 + 102,49(X_2^S)^2 - 86,41 (X_3^S)^2 - 72,88 (X_1^S X_2^S) - 16,39 (X_1^S X_3^S) + 237,66 (X_2^S X_3^S)$$

Trong đó các biến  $X_i^S$  là các biến chuẩn. Kết quả từ mô hình cho  $R^2 = 0,941$ , điều này cho thấy mô hình phản ánh 94,1% so với thực tế.

Sử dụng công thức  $X_i^S = 2 (X_i - \text{mức gốc}) / (\text{mức trên} - \text{mức dưới})$  để chuyển biến chuẩn thành biến thực, chúng tôi đã xây dựng được mô hình phản ánh thực tế các yếu tố công nghệ trên ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa của lá sim như sau:

$$Y = 3093,856 + 20,488 X_1 - 55,106 X_2 - 13,332 X_3 - 0,13 X_1^2 + 0,256 X_2^2 - 0,054 X_3^2 - 0,146 X_1 X_2 - 0,020 X_1 X_3 + 0,297 X_2 X_3$$



Hình 7. Mô hình đáp ứng bề mặt sự ảnh hưởng của các yếu tố công nghệ tới khả năng chống oxy hóa của dịch chiết và giá trị hàm lượng polyphenol tổng số, DPPH thu được tại điểm tối ưu



Từ mô hình trên và từ kết quả phân tích phương sai ở bảng 3, chúng tôi nhận thấy cả 3 yếu tố nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm mục tiêu Y là khả năng kháng oxi hóa ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, các yếu tố công nghệ khác nhau có chiều ảnh hưởng cũng khác nhau. Kết quả từ mô hình cho thấy các yếu tố công nghệ riêng lẻ ethanol ( $X_1$ ), nhiệt độ ( $X_2$ ), thời gian ( $X_3$ ) đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y (với giá trị  $p$  lần lượt là  $0,0131 < 0,0001$  và  $0,0039$ ) và bình phương của chúng cũng ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm này ( $p = 0,0256$ ,  $p = 0,0076$  và  $p = 0,0190$ ) trong khi đó các cặp tương tác ảnh hưởng không có ý nghĩa đến hàm mục tiêu ( $p > 0,05$ ) trừ cặp tương tác nhiệt độ - thời gian ( $p < 0,05$ ).

Mô hình đáp ứng bề mặt (hình 7) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và 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 cho thấy khả năng chống oxi hóa đạt cực đại ( $1408,99 \mu\text{M TE/g DW}$ ) khi lá sim được tách chiết ở nồng độ ethanol 65%, nhiệt độ  $45^\circ\text{C}$  và thời gian chiết 30 phút. Từ kết quả của các yếu tố công nghệ trên và dựa vào mô hình xây dựng cho polyphenol tổng số (không được trình bày trong phạm vi bài báo này), chúng tôi đã xác định được hàm lượng polyphenol tổng số là  $76,42 \text{ mg GAE/g DW}$ .

Sau khi xác định được các điều kiện tối ưu trên, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra kết quả của mô hình bằng thực nghiệm. Khi lặp lại thí nghiệm 4 lần tại điều kiện tối ưu, chúng tôi thu được các kết quả về hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa không có sự khác biệt so với các kết quả tính toán từ mô hình ( $p < 0,05$ ).

## KẾT LUẬN

Từ cây sim, so với búp và quả, lá có hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng chống oxi hóa cao nhất ( $104,16 \pm 26,2 \text{ mg GAE/g DW}$  và  $1026,89 \pm 161,5 \mu\text{M TE/g DW}$ ).

Đã xác định được các yếu tố nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian chiết và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng polyphenol tổng số và khả năng kháng oxi hóa của dịch chiết lá sim, trong đó ba

yếu tố đầu ảnh hưởng mạnh nhất. Ba yếu tố này được chọn để đưa vào mô hình mô tả quá trình tách chiết polyphenol kháng oxi hóa từ lá sim.

Đã xây dựng được mô hình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố nồng độ ethanol ( $X_1$ ), nhiệt độ ( $X_2$ ) và thời gian chiết ( $X_3$ ) đến khả năng chống oxi hóa (Y) như sau:

$$Y = 3093,856 + 20,488 X_1 - 55,106 X_2 - 13,332 X_3 - 0,13 X_1^2 + 0,256 X_2^2 - 0,054 X_3^2 - 0,146 X_1 X_2 - 0,020 X_1 X_3 + 0,297 X_2 X_3$$

Điều kiện tách chiết tối ưu cho phép thu được dịch chiết có khả năng kháng oxi hóa cao nhất với nồng độ ethanol 65%, nhiệt độ  $45^\circ\text{C}$  và thời gian 30 phút. Ở các điều kiện này dịch chiết thu được có hàm lượng polyphenol tổng số là  $76,42 \text{ mg GAE/g DW}$  và khả năng chống oxi hoá là  $1408,99 \mu\text{M TE/g DW}$ .

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asadhawut H., Wilawan M., 2008. New acylphloroglucinols from the leaves of *Rhodomyrtus tomentosa*. Tetrahedron, 64: 11193-11197.
2. Boeing J. S., Barizao E. O., BC E. S., Montanher P. F., De Cinque Almeida V. Visentainer J. V., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. Chem Cent J., 8: 48.
3. Counet C., Collin S., 2003. Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. J Agric Food Chem., 51: 6816-22.
4. Dachriyanus S., Sargent M. V., Skelton B. W., Soediro I. et al., 2002. Rhodomyrtone, an antibiotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. Aust. J. Chem., 55: 229-232.
5. Geetha K. M., Sridhar C., Murugan V., 2010. Antioxidant and healing effect of aqueous alcoholic extract of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk on chronic gastric ulcers in rats. Journal of Pharmacy Research, 3: 2860-2862.
6. Phan Minh Giang, Trần Thị Hà, Nguyễn Thị Hồng Anh, Phan Tổng Sơn, Hideaki

- Otsuka, 2007. Phytochemical study of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. (Myrtaceae). Tuyển tập các công trình hội nghị khoa học và công nghệ hóa học hữu cơ toàn quốc lần thứ IV, Hà Nội: 340-345.
7. Lại Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thị Na, Lê Thị Trang, 2012. Mô hình hóa quá trình chiết polyphenol từ quả sim (*Rhodomyrtus tomentosa* Ait, Hassk) thu hái tại Hòa Bình. Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm, 6(3+4): 191-201.
  8. Kumar A., Ilavarasan R., Jayachandran T., Decaraman M., Aravindhan P., Padmanaban N. and Krishna M. R. V., 2009. Phytochemical investigation on a tropical plants. Pak J. Nutri., 8: 83-85.
  9. Hoàng Văn Lưu, 2012. Tách và xác định cấu trúc một số hợp chất từ hoa cây sim. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Vinh, 41(3A): 56-60.
  10. Limsuwan S., Voravuthikunchai S. P., 2008. *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr, *Eleutherine americana* Merr. And *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and anti-quorum sensing in *Streptococcus pyogenes*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53: 429-436.
  11. Liu G. L., Guo H. H., Sun Y. M., 2012. Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and identification of anthocyanins in the extract using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). International Journal of Molecular Sciences, 13: 6292-6302.
  12. Miyake Y., Nojima J., 2006. Skin Cosmetic and Food/Drink for Cosmetogical Use, Maruzen Pharmaceutical, Hiroshima, Japan.
  13. Nojima J., Murakami T., Kiso A., 2007. Piceatannol 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside for antioxidants, anti-inflammatory agents, skin-lightening agents, antiaging agents, tyrosinase inhibitors, and skin cosmetics. Jpn Kokai Tokyo Koho. JP 2007 223919 A 20070906.
  14. Ong H. C., Nordiana M., 1999. Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia. Fitoterapia 70: 502-513.
  15. Saising J., Hiranrat A., Mahabusarakam W., Ongsakul M., Voravuthikunchai S. P., 2008. Rhodomertone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as a natural antibiotic for staphylococcal cutaneous infections. J. Health Sci., 54:589-595.
  16. Silva E., Rogez H., Larondelle Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. Separation and Purification Technology, 55: 381-387
  17. Singleton V. L., Joseph A., Rossi J. R. J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticulture, 16: 144-158.
  18. Souza J. N. S., Silva E. M., Loir A., J.-F. R., Rogez, H., Larondelle Y., 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. Food Chemistry, 106: 331-339.
  19. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. Food Chemistry, 113 (4): 1226-1233.
  20. Tung N. H., Ding Y., Choi E. M., Kiem P. V., Minh C. V., Kim Y. H., 2009. New anthracene glycosides from *Rhodomyrtus tomentosa* stimulate osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells. Archives of Pharmacal Research, 32(4): 515-520.
  21. Voravuthikunchai S. P., Limsuwan S., Chusri. S., 2007. New perspectives on herbal medicines for bacterial infections, p. 41-101. In G. N. Govil, V. K. Singh, and N. T. Siddqui (ed.), Recent progress in medicinal plants, vol. 18. Natural products II. Studium Press, Houston.
  22. Wei F., 2006. Manufacture of traditional Chinese medicine composition for treating urinary tract infection (Gungxi Huahong Pharmaceutical Co., Ltd., People's Republic

- of China; Shanghai Fosun Pharmaceutical (Group) Co., Ltd.), Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu. People's Republic of China patent. CN: 1853687.
23. Wikipedia, 2015. Thông nước. Bách khoa toàn thư mở [http://vi.wikipedia.org/wiki/M%E1%BA%ADt\\_sim](http://vi.wikipedia.org/wiki/M%E1%BA%ADt_sim). Tra cứu 28/7/2015.
24. Wu L. Y., Juan C. C., Ho L. T., Hsu Y. P., Hwang L. S., 2004. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem*, 52: 643-648.

**OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS THAT HAVE HIGH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. (Sim) IN CHI LINH, HAI DUONG**

**Hoang Thi Yen<sup>1</sup>, Trinh Thi Thuy Linh<sup>1</sup>, Mai Chí Thành<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Thu Huyen<sup>2</sup>, Lai Thi Ngoc Ha<sup>3</sup>, Bui Van Ngoc<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, VAST

<sup>2</sup>Thai Nguyen University of Sciences

<sup>3</sup>Vietnam National University of Agriculture

**SUMMARY**

Rose myrtle, *Rhodomyrtus tomentosa*, has long been used to produce beverages, cosmetics, and pharmaceutical products since its leaves and stem contain the large amounts of polyphenols which have high antioxidant capacity. In the present study, the optimal conditions for extraction of polyphenolic compounds with high antioxidant capacity from *R. tomentosa* were determined by nonlinear programming. From three parts of *R. tomentosa* asleaves, stems and fruits, leaves contained the highest total polyphenol content and antioxidant capacity (104.16±26.2 mg GAE/g DW and 1026.89±161.5µM TE/g DW). Besides, the effect of three technological factors including ethanol concentration, temperature and extraction time on the phenolic extraction yield from *R. tomentosaleaves* were investigated. The response surface methodology and a rotatable central composite design consisting of 21 experimental runs in triplicate at the center point were then applied to create the model describing the extraction. Three independent variables, the ethanol concentration (X1), temperature (X2), and extraction time (X3) that affect the response, the antioxidant capacity of the extracts (Y) were determined and other regression coefficients for intercept, linear, quadratic, and interaction terms were also induced, thereby the model of the polyphenol extraction was obtained as follows:  $Y = 3093.856 + 20.488X_1 - 55.106X_2 - 13.332X_3 - 0.13X_1^2 + 0.256 X_2^2 - 0.054X_3^2 - 0.146 X_1X_2 - 0.020X_1X_3 + 0.297X_2X_3$ . The obtained model fitted well to the measured values ( $R^2 = 0.941$ ). Under the optimal conditions, 65% ethanol, 45°C, and for 30 min, the total polyphenol content of 76.42 mg GAE/g DW and antioxidant capacity of 1408.99 µM TE/g DW were achieved. To validate the model, the extractions were performed with four replicates under these conditions. The experimental values were within the 95% confidence interval of the predicted values ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** *Rhodomyrtus tomentosa*, high antioxidant capacity, optimal conditions for extraction, response surface methodology, total polyphenol content.

Ngày nhận bài: 21-9-2015