

## TỐI ƯU HÓA ĐỒNG THỜI CÁC ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT FLAVONOID TỔNG SỐ TỪ QUẢ ĐẬU COVE (*Phaseolus vulgaris* L.)

NGUYỄN THỊ THU THỦY <sup>(1,2)</sup>, ĐÀO NGUYỄN MẠNH <sup>(1)</sup>, ĐỖ THỊ THÙY TRANG <sup>(1)</sup>,  
VŨ THỊ LOAN <sup>(1)</sup>, TRẦN THANH TUẤN <sup>(1)</sup>, QUÁCH THỊ QUỲNH <sup>(1)</sup>, NGUYỄN VĂN THÀNH <sup>(3)</sup>

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu cove (*Phaseolus vulgaris* L.) là một loài cây trồng phổ biến tại Việt Nam, cũng như trên toàn thế giới. Bên cạnh hàm lượng lớn các polysaccharid, đậu cove còn chứa nhiều thành phần hoạt chất quý giá với những tác dụng sinh học quý như chống oxy hóa, chống ung thư, ngăn ngừa bệnh tiểu đường v.v [1-3]. Trong số các thành phần thứ cấp của đậu cove, flavonoid cũng là một lớp chất thường gặp [1]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các flavonoid như myricetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-(6"-malonyl)glucoside và kaempferol 3-*O*-(malonyl)glucoside chiếm thành phần đáng kể trong đậu cove (*P. vulgaris*) [4]. Các hợp chất flavonoid được biết đến với rất nhiều hoạt tính sinh học quý giá [5], do đó, việc tạo ra các chế phẩm từ tự nhiên giàu thành phần hoạt chất này có ý nghĩa rất lớn về mặt y học, khoa học, cũng như đời sống. Dù là một loại thực phẩm rất phổ biến trong đời sống và đã được khoa học thế giới nghiên cứu rất nhiều về thành phần và tác dụng sinh học, cho tới nay, tại Việt Nam, chưa có một công bố nào về khảo sát các điều kiện chiết xuất flavonoid từ đậu cove được xuất bản. Bởi quá trình tối ưu hóa cần thực hiện nhiều thí nghiệm nhằm lựa chọn các thông số khác nhau nên các nghiên cứu hiện đại thường sử dụng các phương pháp quy hoạch thực nghiệm như thiết kế tổ hợp trung tâm (Central Composite Designs - CCD) hoặc Box-Behnken để thiết kế và lựa chọn những thí nghiệm quan trọng nhất, đồng thời giảm bớt số lượng thí nghiệm không cần thiết [6-9]. Kết quả thực nghiệm kết hợp sử dụng phương pháp tối ưu hóa, ví dụ phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology - RSM) sẽ cho ra điều kiện tốt nhất để đạt được mục tiêu của thí nghiệm [7-9].

Nghiên cứu này của chúng tôi sử dụng phương pháp Box-Behnken để thiết kế và khảo sát các thông số về loại và tỷ lệ dung môi cũng như điều kiện nhiệt độ chiết xuất flavonoid từ đậu cove. Các thông số được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology - RSM), từ đó lựa chọn được điều kiện để tạo ra cao chiết với hàm lượng flavonoid và hoạt tính chống gốc tự do cao nhất.

### 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu quả đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) (20 kg) được thu thập tại chợ địa phương tại quận Nam Từ Liêm, thành phố Hà Nội. Mẫu được rửa sạch bằng nước, loại bỏ những quả bị hỏng rồi được sấy khô trong tủ sấy ở 55 °C, sau đó đem nghiền thành bột và bảo quản ở -20°C cho tới khi sử dụng.

## 2.2. Khảo sát đơn yếu tố

Cân các mẫu bột đậu có khối lượng  $2,00 \pm 0,02$  g rồi chuyển vào ống chiết mẫu. Để khảo sát khoảng nồng độ dung môi thích hợp, các mẫu được chiết với 60 mL ethanol có nồng độ lần lượt là 0%, 30%, 50%, 70% và 90% v/v ở nhiệt độ cố định là 50 °C. Để khảo sát khoảng nhiệt độ làm việc, các mẫu được chiết với 60 mL ethanol 90% trong bể ổn nhiệt ở các nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C. Để khảo sát tỷ lệ tối ưu của thể tích dung môi/khối lượng nguyên liệu, các mẫu được chiết với ethanol 90% trong bể ổn nhiệt ở 50°C theo các tỷ lệ 10, 20, 40, 60, 80 mL/g. Từng thí nghiệm được tiến hành trong vòng 60 phút, bình chiết được gắn sinh hàn ở trên đỉnh để hạn chế sự bay hơi dung môi, sau đó lọc nóng hỗn hợp để thu lấy dịch chiết. Phần bã được rửa lại trên phễu lọc bằng 10 mL dung môi tương ứng, sau đó cất loại hoàn toàn dung môi để thu được cao chiết.

## 2.3. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa

Ba yếu tố cần khảo sát nhằm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất flavonoid từ quả đậu cove là nồng độ ethanol (% v/v EtOH, %), nhiệt độ chiết xuất (T, °C) và tỷ lệ thể tích dung môi trên mỗi gram nguyên liệu (R, mL/g). Dữ liệu về giá trị cực đại và cực tiểu của từng yếu tố đầu vào (factor) (được lựa chọn từ các thí nghiệm đơn yếu tố) được nhập vào phần mềm Design Expert (bảng 1). Sau đó, sử dụng phương pháp Box-Behnken, phần mềm tự động tính toán và lựa chọn 17 thí nghiệm tương ứng. Các thí nghiệm này được tiến hành để đo các thông số đầu ra (response) hàm lượng flavonoid tổng số, cũng như phần trăm ức chế gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) của sản phẩm.

**Bảng 1.** Thông số lựa chọn và mã hóa với từng yếu tố cần khảo sát

| Yếu tố                          | Cực tiểu (-1) | Trung vị (0) | Cực đại (1) |
|---------------------------------|---------------|--------------|-------------|
| X <sub>1</sub> : % v/v EtOH (%) | 0             | 45           | 90          |
| X <sub>2</sub> : T (°C)         | 30            | 55           | 80          |
| X <sub>3</sub> : R (mL/g)       | 10            | 30           | 50          |

Sau khi thu thập đầy đủ kết quả của 17 thí nghiệm, dữ liệu sẽ được xử lý trên phần mềm Design Expert. Phương pháp RSM được sử dụng, từ đó, lựa chọn được dạng phương trình tối ưu cho mô hình và dự đoán được các thông số tối ưu cho quá trình chiết xuất. Tính liên tục và mức độ không phù hợp, cũng như các hệ số được đánh giá thông qua kết quả phân tích phương sai (ANOVA). Một cách tổng quát, phương trình hồi quy biểu diễn quan hệ giữa thông số đầu ra và các yếu tố đầu vào có dạng:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Với Y là các thông số đầu ra (hàm lượng flavonoid tổng số hoặc phần trăm ức chế gốc tự do DPPH); X<sub>i</sub>, X<sub>j</sub> là các yếu tố đầu vào (% v/v EtOH, T hoặc R);  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  là các hệ số tương quan [7].

## 2.4. Phương pháp đánh giá hàm lượng flavonoid tổng số

Hàm lượng flavonoid tổng số (TFC) được xác định theo phương pháp của Chandra và cộng sự [10] với một vài thay đổi phù hợp với điều kiện thực nghiệm. Chất chuẩn quercetin được pha trong ethanol 96% ở các nồng độ 10, 50, 100, 150, 200, 250 và 300 µg/mL. Các mẫu cao chiết của từng thí nghiệm được pha trong ethanol 70% ở nồng độ 1 mg/mL hoặc pha loãng ở nồng độ thích hợp. Thêm 100 µL dung dịch NaNO<sub>2</sub> 5% vào 500 µL mỗi dung dịch chất chuẩn quercetin hoặc dung dịch mẫu thử, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó thêm tiếp 100 µL dung dịch AlCl<sub>3</sub> 10%, trộn đều và để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Cuối cùng, thêm 500 µL NaOH 1M vào hỗn hợp phản ứng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Chuyển các dung dịch sau phản ứng vào phiến 96 giếng và đo mật độ quang ở bước sóng 510 nm.

TFC trong mỗi mẫu cao chiết được tính từ phương trình đường chuẩn quercetin theo công thức (1).

$$TFC = \frac{A_i - b}{a \times C_i} \quad (2)$$

Với TFC là hàm lượng flavonoid tổng số của mẫu cao chiết, tính bằng milligram tương đương quercetin trên mỗi gram cao chiết (mg QE/g); A<sub>i</sub> là mật độ quang trung bình của mẫu thử ở bước sóng 510 nm; a và b lần lượt là hệ số của phương trình đường chuẩn quercetin có dạng A = aC + b; C<sub>i</sub> là nồng độ của mẫu thử (mg/mL).

## 2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính chống gốc tự do DPPH

Mẫu thử và DPPH được pha loãng trong DMSO với nồng độ 30 µg/mL. 20 µL mẫu thử được ủ với 200 µL dung dịch DPPH, ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 20 phút và đo trên máy ELISA ở bước sóng 517 nm. Chất đối chứng ascorbic được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần.

Phần trăm ức chế gốc tự do DPPH (DPPH %I) được tính theo công thức sau:

$$DPPH \% I = 100\% - [(OD_m) / (OD_{dc}) \times 100\%] \quad (3)$$

- OD<sub>m</sub>: Mật độ quang trung bình của mẫu thử ở nồng độ 30 µg/mL;

- OD<sub>dc</sub>: Mật độ quang trung bình của mẫu control (không có mẫu thử, chỉ có DPPH, coi như giá trị ức chế 0%).

Giá trị nồng độ ức chế trung bình (IC<sub>50</sub>) được tính dựa trên đường chuẩn với %I của dải nồng độ thích hợp cho từng mẫu thử.

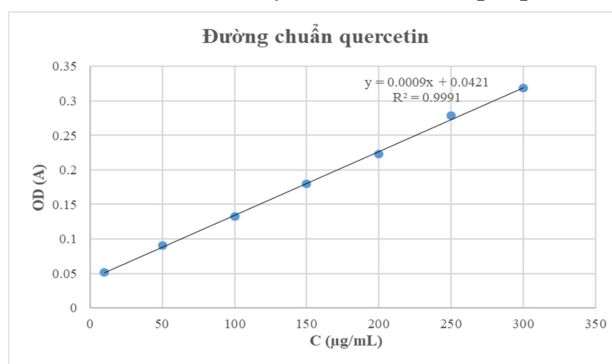
## 2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Mô hình Box-Behnken và phương pháp bề mặt đáp ứng RSM được triển khai bằng phần mềm Design Expert 12 (Stat-Ease, Hoa Kỳ). Số liệu các thí nghiệm phân tích được tổng hợp và tính toán trên phần mềm Microsoft Excel (Microsoft, Hoa Kỳ).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố

Các thí nghiệm được tiến hành để lần lượt khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết xuất và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến TFC trong cao chiết từ quả đậu cove cũng như DPPH %I của sản phẩm. Khi khảo sát ảnh hưởng của một yếu tố, các yếu tố khác sẽ được cố định. TFC của các mẫu thí nghiệm được tính toán dựa theo đường chuẩn quercetin (hình 1) có phương trình  $y = 0,0009x + 0,0421$  với hệ số xác định  $R^2 = 0,9991$  đảm bảo độ tuyến tính cho các phép định lượng.

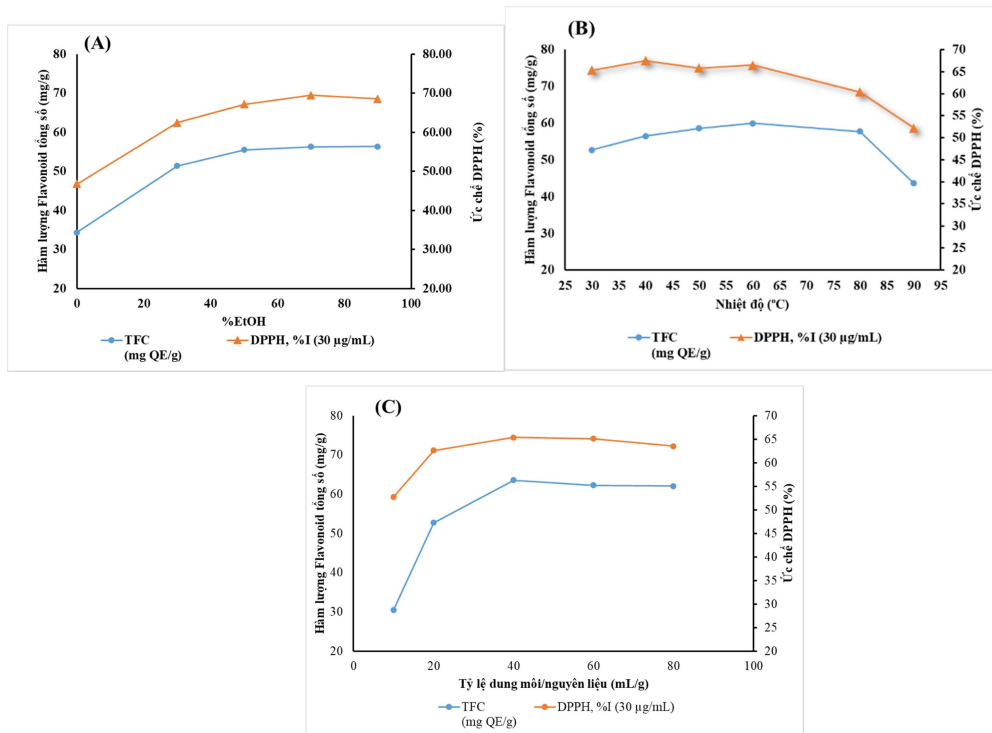


Hình 1. Đường chuẩn quercetin

Hình 2A biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ ethanol tới TFC và DPPH %I của cao chiết từ quả đậu cove. Có thể thấy, hai thông số này tăng lên khi nồng độ ethanol tăng dần từ 0 đến khoảng 70%, sau đó, các thông số này chỉ biến động nhẹ khi tăng dần nồng độ ethanol từ 70% đến 90%.

Trong khi đó, với dung môi chiết là ethanol 90%, hàm lượng flavonoid tăng nhẹ từ 52 lên 60 mg/g khi tăng nhiệt độ từ 30 tới 60 °C, sau đó, các thông số đều giảm nhanh khi tiếp tục tăng nhiệt độ (hình 2B). Có thể giải thích tình trạng này bởi hai nguyên nhân: thứ nhất, các hợp chất thứ cấp thường không bền nhiệt, do đó, khi nhiệt độ tăng lên trên 60 °C có thể gây ra sự phân hủy của các hợp chất flavonoid và làm giảm hoạt tính chống gốc tự do DPPH. Mặt khác, do sử dụng dung môi ethanol 90% (điểm sôi khoảng 80 °C) nên ở khoảng 80-90 °C, sự bay hơi của dung môi là rất mạnh dẫn tới thay đổi đáng kể về thể tích dung môi và làm giảm hiệu quả trích ly. Hàm lượng TFC và hoạt tính DPPH đạt cực đại khi tỷ lệ dung môi/khối lượng ở mức 40 mL/g (hình 2C) và hầu như không đổi khi gia tăng lượng dung môi sử dụng. Sử dụng quá nhiều dung môi gây ra lãng phí lớn về hóa chất cũng như năng lượng cần thiết để cất loại và xử lý chất thải.

Từ ba kết quả thử nghiệm trên, có thể ước lượng các khoảng giá trị cần khảo sát của các thông số đầu vào. Ảnh hưởng từ thay đổi của nồng độ ethanol là khá phức tạp nên cần khảo sát trên khoảng rộng từ 0-90%. Trong khi đó, để tránh sự bay hơi quá mạnh của dung môi trong quá trình chiết, khoảng nhiệt độ nên được giới hạn trong khoảng từ 30°C đến 80°C. Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu trong khoảng 50-80 ml/g không tạo ra thay đổi đáng kể về hàm lượng flavonoid tổng số và hoạt tính quét gốc tự do DPPH, do đó, thông số này sẽ được giới hạn ở khoảng 10-50 ml/g.



**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ ethanol (A), nhiệt độ chiết xuất (B) và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (C) tới TFC và DPPH %I

### 3.2. Lựa chọn mô hình hồi quy

Khoảng giá trị của yếu tố đầu vào từ các thí nghiệm đơn yếu tố được đưa vào thiết kế thí nghiệm bằng phương pháp Box-Behnken. Kết quả của các thí nghiệm đã thiết kế được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2.** Các thí nghiệm được thiết kế bằng phương pháp Box-Behnken và các giá trị đầu ra tương ứng

| STT | % v/v EtOH | Nhiệt độ (°C) | Tỷ lệ (mL/g) | TFC (mg QE/g) | DPPH, %I (30 µg/mL) |
|-----|------------|---------------|--------------|---------------|---------------------|
| 1   | 45         | 55            | 30           | 60,43         | 69,51               |
| 2   | 45         | 55            | 30           | 58,17         | 68,63               |
| 3   | 45         | 30            | 10           | 24,15         | 47,07               |
| 4   | 45         | 55            | 30           | 59,29         | 68,02               |
| 5   | 0          | 55            | 10           | 18,29         | 40,67               |
| 6   | 45         | 80            | 10           | 27,37         | 58,21               |
| 7   | 90         | 80            | 30           | 56,79         | 59,76               |
| 8   | 0          | 80            | 30           | 35,12         | 52,62               |

| STT | % v/v EtOH | Nhiệt độ (°C) | Tỷ lệ (mL/g) | TFC (mg QE/g) | DPPH, %I (30 µg/mL) |
|-----|------------|---------------|--------------|---------------|---------------------|
| 9   | 45         | 55            | 30           | 61,89         | 70,52               |
| 10  | 45         | 80            | 50           | 60,92         | 69,15               |
| 11  | 0          | 55            | 50           | 28,97         | 50,43               |
| 12  | 90         | 55            | 50           | 54,87         | 72,19               |
| 13  | 45         | 30            | 50           | 47,41         | 66,63               |
| 14  | 0          | 30            | 30           | 26,38         | 36,90               |
| 15  | 90         | 30            | 30           | 58,09         | 67,88               |
| 16  | 45         | 55            | 30           | 54,74         | 67,90               |
| 17  | 90         | 55            | 10           | 32,32         | 54,15               |

Giá trị tối ưu về nồng độ ethanol, nhiệt độ và tỷ lệ dung môi chiết xuất được tính toán bằng phương pháp bề mặt đáp ứng dựa trên kết quả của 17 thí nghiệm trên. Kết quả phân tích phương sai ANOVA (bảng 3 và bảng 4) cho thấy phương trình hồi quy bậc 2 được lựa chọn là dạng mô hình phù hợp nhất do có tính liên tục rất có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) và mức độ bất tương thích không đáng kể ( $p > 0,05$ ) cho việc dự đoán điểm tối ưu cho cả hai yếu tố đầu ra là TFC và DPPH %I. Mặt khác, các hệ số tương quan  $R^2$ ,  $R^2_{adj}$  (bảng 3 và bảng 4) ở mức 0,96-0,99 cho thấy mức độ phù hợp rất cao của mô hình hồi quy đối với số liệu khảo sát thực tế.

### 3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố đầu vào tới hàm lượng flavonoid tổng số trong cao chiết từ đậu cove

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết xuất và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến TFC trong cao chiết từ quả đậu cove được trình bày tại bảng 3. Có thể thấy, cả ba yếu tố này đều có ảnh hưởng đáng kể (có ý nghĩa thống kê, với  $p < 0,05$ ) tới quá trình chiết xuất flavonoid từ quả đậu cove. Bên cạnh đó, sự thay đổi đồng thời của nhiệt độ và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu cũng ảnh hưởng mạnh đến giá trị TFC. Tuy nhiên, sự thay đổi đồng thời của nồng độ ethanol với hai yếu tố còn lại hầu như không tác động tới giá trị TFC, do đó, có thể lược bớt hai biến số AB và AC trong phương trình hồi quy.

**Bảng 3.** Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình hồi quy được lựa chọn với biến đầu ra TFC. Những thông số có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) được tô đậm

| Yếu tố                  | Kiểm định F   | <i>p</i> |
|-------------------------|---------------|----------|
| Mô hình                 | 43,13         | < 0,0001 |
| Mức độ bất tương thích  | 2,22          | 0,228    |
| <b>Đánh giá mô hình</b> |               |          |
| $R^2$                   | <b>0,9823</b> |          |
| $R^2_{adj}$             | <b>0,9595</b> |          |

| Yếu tố                                                                   | Kiểm định F   | p                  |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| <b>Các yếu tố ảnh hưởng tới biến đầu ra TFC</b>                          |               |                    |
| A - Nồng độ EtOH                                                         | <b>112,8</b>  | <b>&lt; 0,0001</b> |
| B - Nhiệt độ                                                             | <b>10,4</b>   | <b>0,0145</b>      |
| C - Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu                                           | <b>92,33</b>  | <b>&lt; 0,0001</b> |
| AB (Nồng độ EtOH × Nhiệt độ)                                             | 2,26          | 0,1764             |
| AC (Nồng độ EtOH × Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu)                           | 0,5318        | 0,4895             |
| BC (Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu × Nhiệt độ)                               | <b>6,16</b>   | <b>0,042</b>       |
| A <sup>2</sup> (Nồng độ EtOH × Nồng độ EtOH)                             | <b>42,98</b>  | <b>0,0003</b>      |
| B <sup>2</sup> (Nhiệt độ × Nhiệt độ)                                     | <b>6,47</b>   | <b>0,0384</b>      |
| C <sup>2</sup> (Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu × Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu) | <b>101,24</b> | <b>&lt; 0,0001</b> |

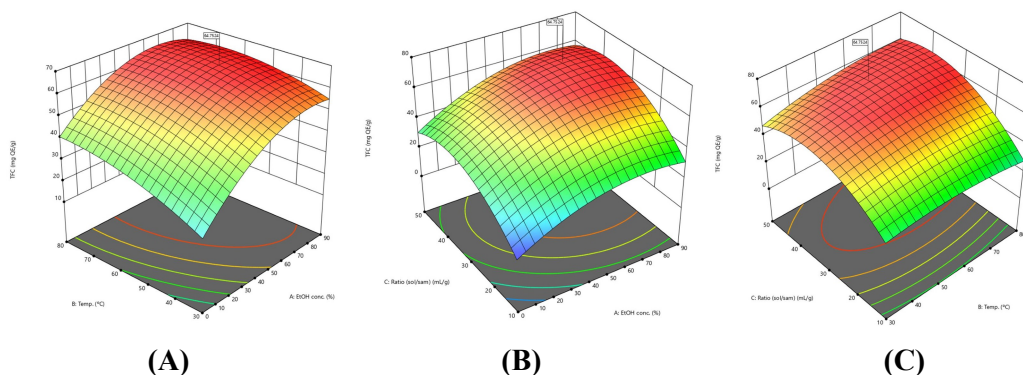
Phương trình hồi quy biểu thị mối quan hệ giữa TFC và các yếu tố đầu vào sẽ có dạng:

$$\begin{aligned} \text{TFC} = & -36,5934 + 0,8349 \times A + 0,7328 \times B + 2,5064 \times C + \\ & + 0,0083 \times B \times C - 0,0053 \times A^2 - 0,0066 \times B^2 - 0,0409 \times C^2 \end{aligned} \quad (4)$$

Trong đó: A: Nồng độ EtOH; B: Nhiệt độ; C: Tỷ lệ dung môi /nguyên liệu

TFC: Hàm lượng flavonoid tổng số của sản phẩm

Mối quan hệ giữa các yếu tố điều kiện chiết xuất với giá trị TFC được thể hiện qua hình 3 cũng như các hệ số của phương trình (3). Có thể thấy, sự gia tăng của các yếu tố điều kiện chiết xuất có thể giúp làm tăng TFC của sản phẩm. Tuy nhiên, tới một giới hạn nhất định, sự gia tăng các thông số điều kiện ban đầu có thể không còn hiệu quả rồi làm giảm giá trị TFC. Ảnh hưởng của các yếu tố đầu vào tới hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết từ đậu cove.



**Hình 3.** Các mặt bậc hai biểu diễn mối tương quan giữa TFC của cao chiết với các thông số đầu vào (A) nồng độ ethanol và nhiệt độ, (B) nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, (C) nhiệt độ chiết và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết xuất và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đến hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết từ quả đậu cove được trình bày tại bảng 4. Có thể thấy, cả ba yếu tố này đều có ảnh hưởng đáng kể (có ý nghĩa thống kê, với  $p < 0,05$ ) tới quá trình chiết xuất flavonoid từ quả đậu cove. Bên cạnh đó, sự thay đổi đồng thời của từng cặp yếu tố cũng ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của cao chiết.

**Bảng 4.** Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình hồi quy được lựa chọn với biến đầu ra DPPH I%. Những thông số có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) được tô đậm

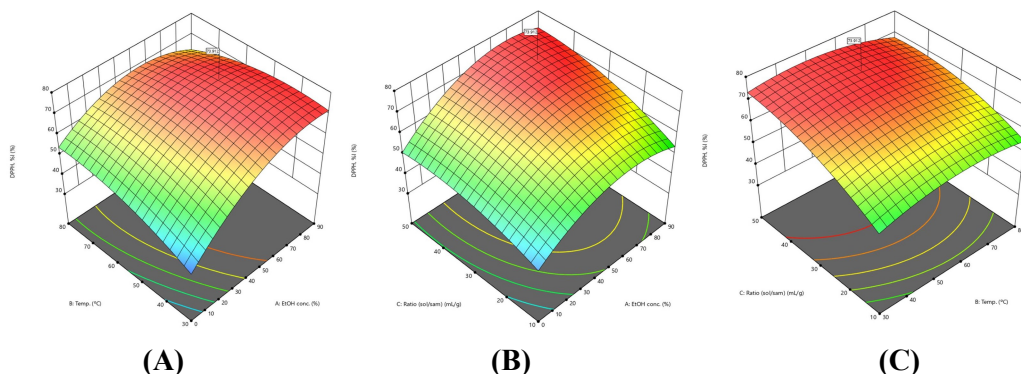
| Yếu tố                                                                   | Kiểm định F   | $p$             |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------|
| Mô hình                                                                  | 135,81        | < 0,0001        |
| Mức độ bất tương thích                                                   | 1,8           | 0,2866          |
| <b>Đánh giá mô hình</b>                                                  |               |                 |
| R <sup>2</sup>                                                           | <b>0,9943</b> |                 |
| R <sup>2</sup> adj                                                       | <b>0,9870</b> |                 |
| <b>Các yếu tố ảnh hưởng tới biến đầu ra DPPH I%</b>                      |               |                 |
| A-Nồng độ EtOH                                                           | 135,81        | < <b>0,0001</b> |
| B-Nhiệt độ                                                               | 413,76        | < <b>0,0001</b> |
| C-Tỷ lệ dung môi /nguyên liệu                                            | 34,75         | <b>0,0006</b>   |
| AB (Nồng độ EtOH × Nhiệt độ)                                             | 261,31        | < <b>0,0001</b> |
| AC (Nồng độ EtOH × Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu)                           | 87,39         | < <b>0,0001</b> |
| BC (Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu × Nhiệt độ)                               | 10,54         | <b>0,0141</b>   |
| A <sup>2</sup> (Nồng độ EtOH × Nồng độ EtOH)                             | 11,43         | <b>0,0118</b>   |
| B <sup>2</sup> (Nhiệt độ × Nhiệt độ)                                     | 272,91        | < <b>0,0001</b> |
| C <sup>2</sup> (Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu × Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu) | 49,24         | <b>0,0002</b>   |

Phương trình hồi quy biểu thị mối quan hệ giữa TFC và các yếu tố đầu vào sẽ có dạng:

$$\text{DPPH I\%} = -15,1742 + 0,8824 \times A + 1,2415 \times B + 1,1415 \times C - 0,0053 \times A \times B + 0,0023 \times A \times C + 0,0043 \times B \times C - 0,0051 \times A^2 - 0,0070 \times B^2 - 0,0107 \times C^2 \quad (5)$$

Trong đó: A: Nồng độ EtOH; B: Nhiệt độ; C: Tỷ lệ dung môi /nguyên liệu; DPPH I% là phần trăm ức chế của cao chiết.

Mối quan hệ giữa các yếu tố điều kiện chiết xuất với giá trị DPPH %I được thể hiện qua hình 4 cũng như các hệ số của phương trình (4). Có thể thấy, sự gia tăng của các yếu tố điều kiện chiết xuất có thể giúp làm tăng hoạt tính của sản phẩm. Tuy nhiên, tới một giới hạn nhất định, sự gia tăng các thông số điều kiện ban đầu có thể không còn hiệu quả rồi làm giảm giá trị DPPH %I.



**Hình 4.** Các mặt bậc hai biểu diễn mối tương quan giữa DPPH I% của cao chiết với các thông số đầu vào (A) nồng độ ethanol và nhiệt độ, (B) nồng độ ethanol và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, (C) nhiệt độ chiết và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

### 3.4. Lựa chọn điều kiện chiết xuất tối ưu để tạo cao chiết

Từ mô hình hồi quy tuyến tính trên, có thể xác định quá trình chiết xuất flavonoid từ quả đậu cove sẽ tối ưu ở nhiệt độ 57,86°C với nồng độ ethanol là 68,63% và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 40,71 mL/g. Giá trị TFC và DPPH I% tối ưu kỳ vọng lần lượt là 64,78 mg QE/g và 73,91%.

Để phù hợp với thực tế trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn điều kiện gần giống với tính toán là chiết xuất quả đậu cove trong ethanol 70% ở 60 °C với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 40 mL/g. Hàm lượng TFC trong cao chiết sản phẩm thực tế thu được là 63,21 mg QE/g, trong khi phần trăm ức chế gốc tự do DPPH (ở nồng độ thử nghiệm 30 µg/mL) đạt 72,58%. Giá trị  $IC_{50}$  đối với hoạt tính chống gốc tự do DPPH của cao chiết là 21,69 µg/mL, gần tương đương với đối chứng dương ascorbic acid ( $IC_{50} = 19,07$  µg/mL). Như vậy, kết quả thực nghiệm với tính toán lý thuyết không có quá nhiều chênh lệch. Cao chiết có hàm lượng flavonoid gần tương đương mức tối ưu trên lý thuyết và thể hiện được hoạt tính chống gốc tự do tốt.

## 4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát và tối ưu hóa quy trình tạo cao chiết giàu thành phần flavonoid và có hoạt tính chống gốc tự do DPPH từ quả đậu cove với các thông số nhiệt độ, nồng độ dung môi và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu hợp lý, đảm bảo hiệu quả chiết xuất mà vẫn tiết kiệm hóa chất và năng lượng. Kết quả kiểm định mô hình, phân tích phương sai, cũng như thí nghiệm kiểm chứng điều kiện được lựa chọn có kết quả tương đương với tính toán lý thuyết cho thấy mô hình tối ưu hóa được lựa chọn là chính xác. Kết quả này tạo tiền đề phát triển sản xuất cao chiết giàu flavonoid từ đậu cove ở quy mô lớn hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mora-Escobedo R., Berrios J. D. J, Lopez G. F. G., *Seeds as functional foods and nutraceuticals: New frontiers in food science*, Nova Science Publisher, 2014, p. 168-169.

2. Chávez-Mendoza C., Sánchez E., *Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (Phaseolus vulgaris)*, Implications for Health, 2017, **22**(8):1360.
3. Almuaigel M. F., Seif M. A., Albuali H. W., Alharbi O., Alhawash A., *Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of phaseolus vulgaris pods in streptozotocin-diabetic rats*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, **94**:742-746.
4. Lin L. Z., Harnly J. M., Pastor-Corrales M. S., Luthria D. L., *The polyphenolic profiles of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*, Food chemistry, 2008, **107**(1):399-410.
5. Wang T., Li Q., Bi K., *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, **13**(1):12-23.
6. Boonchu T., Utama-ang N., *Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (Vitis vinifera L.) pomace*, Journal of Food Science and Technology, 2015, **52**(2):783-792.
7. Cao Q., Yan J., Sun Z., Gong L., Wu H., Tan S., Lei Y., Jiang B., Wang Y., *Simultaneous optimization of ultrasound-assisted extraction for total flavonoid content and antioxidant activity of the tender stem of Triarrhena lutarioriparia using response surface methodology*, Food Science and Biotechnology, 2021, **30**(1):37-45.
8. Elboughdiri N., Ghernaout D., Kriaa K., Jamoussi B., *Enhancing the extraction of phenolic compounds from juniper berries using the Box-Behnken design*, ACS Omega, 2020, **5**(43):27990-28000.
9. Jeganathan P. M., Venkatachalam S., Karichappan T., Ramasamy S., *Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box-Behnken design*, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2014, **44**(1):56-67.
10. Chandra S., Khan S., Avula B., Lata H., Yang M. H., ElSohly M. A., Khan I. A., *Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, p. 253875.

## SUMMARY

### SIMULTANEOUS OPTIMIZATION OF FLAVONOIDS EXTRACTION FROM PODS OF HARI COVERT (*Phaseolus vulgaris* L.)

The condition for flavonoids extraction from *Phaseolus vulgaris* has been optimized using response surface methodology (RSM). Box-Behnken design was adopted to evaluate the effects of the ethanol concentration, temperature, and solvent/material ratio. The selected model was significant ( $p < 0.0001$ ) with  $R^2 > 0.95$ , while the lack of fit was highly insignificant ( $p = 0.2280$ ). The extract under optimized condition had total flavonoid content at 63.21 mgQE/g with considerable DPPH scavenging activity.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, flavonoid, DPPH, antioxidant, optimization, Box-Behnken, đậu cove, chống oxy hoá, tối ưu hoá.

Nhận bài ngày 27 tháng 6 năm 2022

Phản biện xong ngày 29 tháng 8 năm 2022

Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2022

<sup>(1)</sup> Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

<sup>(2)</sup> Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>(3)</sup> Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ: **Nguyễn Thị Thu Thủy**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 0987556168; Email: ntthuy.vietnga@gmail.com