Tối ưu hóa quy trình chiết cao giàu polyphenol và flavonoid từ cây cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.) bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và thông số hòa tan hansen

Optimization of The Extraction Process for Polyphenol- and Flavonoid-Rich Extracts from *Eclipta Prostrata* (l.) L. Using Response Surface Methodology and Hansen Solubility Parameters

Nguyễn Ngọc Thanh, Ths. Nguyễn Hương Giang*

Khoa Dược, Trường Đại học công nghệ Đông Á

***Email: giangnh@eaut.edu.vn**

Abstract

Objectives: *This study focuses on optimizing the technical parameters of an ultrasound-assisted extraction (UAE) process to maximize the recovery of polyphenols and flavonoids from Eclipta prostrata (L.) L. The primary objective is to evaluate the influence of solvent composition, temperature, and extraction time on yield, while employing mathematical modeling to predict the optimal extraction point.* ***Methods:*** *The research methodology involved initial solvent screening based on Hansen Solubility Parameters (HSP) theory and single-factor experimental trials, followed by the application of a Central Composite Design (CCD) to assess multivariate interactions.* ***Results:*** *The findings indicate that acetone exhibits the highest selectivity for phenolic compounds in Eclipta prostrata (L.) L.. A second-order regression model was established with high goodness-of-fit ($R^2 > 0.96$), identifying the optimal conditions as the acetone:water ratio of 88:12 (v/v), the extraction time of 75 minutes, and the temperature of 56°C. Under these parameters, the total polyphenol and flavonoid contents reached 46.196 mg GAE/g and 153.801 mg QE/g, respectively, with a relative error of less than 4% compared to the predicted values.* ***Conclusion:*** *The study confirms the efficacy of integrating UAE and CCD in standardizing the production of Eclipta prostrata (L.) L. extracts. This approach offers significant potential for pharmaceutical applications, particularly in developing high-quality products.*

Keywords: Acetone, Central Composite Design (CCD), *Eclipta prostrata*, Flavonoids, Polyphenols, Hansen Solubility Parameters (HSP).

Tóm tắt

Nghiên cứu này tập trung vào việc giải quyết bài toán tối ưu hóa các thông số kỹ thuật trong quy trình chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm nhằm thu nhận tối đa hàm lượng polyphenol và flavonoid từ cây cỏ mực. Mục đích chính là xác định sự ảnh hưởng của dung môi, nhiệt độ và thời gian đến hiệu suất chiết xuất, đồng thời ứng dụng mô hình toán học để dự đoán điểm tối ưu. Phương pháp nghiên cứu bao gồm việc sàng lọc dung môi thông qua lý thuyết thông số hòa tan Hansen (HSP) và khảo sát thực nghiệm đơn yếu tố, sau đó áp dụng thiết kế tâm tổng hợp (CCD) để đánh

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20

Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

giá các tương tác đa biến. Kết quả cho thấy acetone là dung môi có tính chọn lọc cao nhất đối với các hợp chất phenolic trong cỏ mực. Mô hình hồi quy bậc hai được xây dựng có độ tương thích cao (R^2>0,96), xác định điều kiện tối ưu là tỷ lệ acetone:nước 88:12 (v/v), thời gian chiết 75 phút và nhiệt độ 56°C. Tại điều kiện này, hàm lượng polyphenol đạt 46,196 mgGAE/g và flavonoid đạt 153,801 mgQE/g, sai lệch so với dự đoán dưới 4%. Kết luận của nghiên cứu khẳng định tính hiệu quả của việc kết hợp UAE và CCD trong chuẩn hóa quy trình sản xuất cao dược liệu cỏ mực, mở ra tiềm năng ứng dụng lớn trong ngành công nghiệp dược phẩm để tạo ra các sản phẩm chăm sóc sức khỏe.

Từ khóa: *Acetone, Central Composite Design, Cỏ mực, Flavonoid, Polyphenol, Hansen Solubility Parameter.*

1. Đặt vấn đề

Trong tiến trình hiện đại hóa y học cổ truyền, việc chuyển đổi từ các phương pháp sử dụng thô sang các dạng cao chiết chuẩn hóa giàu hoạt chất đang là xu hướng tất yếu. Việt Nam với nguồn tài nguyên thực vật phong phú đã cung cấp nhiều loài dược liệu quý giá, trong đó cây cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.) thuộc họ Cúc (Asteraceae) là một điển hình tiêu biểu. Cỏ mực, hay còn gọi là cỏ nhọ nồi, từ lâu đã được ghi nhận trong dân gian và y văn với các công dụng như cầm máu, làm đen tóc, thanh nhiệt và giải độc [1, tr282]. Các nghiên cứu dược lý hiện đại đã minh chứng rằng những tác dụng này không phải ngẫu nhiên mà xuất phát từ các nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học mạnh mẽ, tiêu biểu là polyphenol và flavonoid [2, tr 9].

Các hợp chất polyphenol và flavonoid được tổng hợp trong thực vật như những cơ chế phòng vệ tự nhiên chống lại bức xạ tử ngoại và tác nhân gây bệnh. Đối với con người, chúng đóng vai trò là những chất chống oxy hóa tuyệt vời, có khả năng trung hòa gốc tự do, kháng viêm, bảo vệ gan và ngăn ngừa các bệnh mãn tính như ung thư hay tim mạch [3, tr. 2223, 4, tr.334]. Tuy nhiên, để khai thác tối đa giá trị của các hợp chất này, quy trình chiết xuất đóng vai trò then chốt. Các phương pháp truyền thống như đun sắc hoặc ngâm lạnh thường gặp phải những hạn chế về thời gian chiết kéo dài, tiêu tốn lượng lớn dung môi hữu cơ và nguy cơ phân hủy các hoạt chất nhạy cảm với nhiệt độ.

Chiết xuất hỗ trợ siêu âm (Ultrasound-Assisted Extraction - UAE) nổi lên như một kỹ thuật "hóa học xanh" đầy triển vọng. Cơ chế cốt lõi của UAE dựa trên hiệu ứng xâm thực (cavitation): khi sóng siêu âm truyền qua chất lỏng, chúng tạo ra các vi bọt khí liên tục hình thành, phát triển và sụp đổ mãnh liệt. Quá trình này tạo ra các luồng vi dòng (microstreaming) và sóng kích mạnh cục bộ, giúp phá vỡ các rào cản tế bào thực vật, gia tăng khả năng thâm nhập của dung môi và thúc đẩy quá trình khuếch tán hoạt chất ra ngoài môi trường chiết [5, tr.550] [.

Tuy nhiên, hiệu suất của UAE phụ thuộc vào sự tương tác phức tạp của nhiều yếu tố như nồng độ dung môi, nhiệt độ và thời gian thực hiện. Việc thay đổi lần lượt từng yếu tố (One Factor At a Time - OFAT) không chỉ gây lãng phí nguồn lực mà còn bỏ qua sự tương tác giữa các biến số. Do đó, phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology - RSM) với thiết kế tâm

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20

tổng hợp (Central Composite Design - CCD) được ứng dụng để xây dựng mô hình toán học dự đoán chính xác điểm tối ưu [6, tr,15] [7, tr.966-968]. Đặc biệt, nghiên cứu này còn tích hợp lý thuyết Thông số hòa tan Hansen (HSP) để giải thích cơ chế tương tác ở cấp độ phân tử giữa dung môi và các nhóm hoạt chất polyphenol/flavonoid, giúp việc lựa chọn dung môi không còn mang tính cảm tính mà dựa trên nền tảng vật lý hóa học vững chắc [8, tr.135].

Mục tiêu của đề tài là khảo sát và thiết lập các thông số kỹ thuật tối ưu nhất để thu nhận cao chiết có chất lượng cao nhất, góp phần tiêu chuẩn hóa quy trình sản xuất dược liệu từ cỏ mực tại Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu chính là phần trên mặt đất của cây cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.). Mẫu được thu hái tại khu vực Sơn Tây vào tháng 6. Sau khi thu hái, dược liệu được rửa sạch, loại bỏ các lá úa, sâu bệnh, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong vòng 3 ngày để đảm bảo độ ẩm dưới 12%, tránh nấm mốc và sự phân hủy enzyme. Dược liệu khô sau đó được nghiền thành bột mịn, rây qua lưới chuẩn để đạt kích thước hạt đồng nhất, sau đó bảo quản trong bình kín, để nơi khô ráo, tránh ánh sáng trực tiếp trước khi tiến hành thí nghiệm tại Trường Đại học Công nghệ Đông Á.

2.2. Hóa chất và thiết bị

Nghiên cứu sử dụng các hóa chất có độ tinh khiết phân tích cao để đảm bảo tính chính xác của phép đo gồm ethanol 96% (Trung Quốc, 20241104), n-hexane (XiLong, 240522B2), nước cất, acetone (Trung Quốc), Quercetin (Thermo Scienticific, 20250220), $AlCl_3$ (Xilong, 20190412), NaOH (Xilong, 20220508), $NaNO_2$ (Xilong, 180302), Acid Gallic (Biobasic, T5120010), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Biobomei, HG354207), Na_2CO_3 (Xilong, 180923).

Thiết bị phục vụ nghiên cứu bao gồm: bể siêu âm điều khiển được nhiệt độ và thời gian (Lichen LC-UC-100, 540W), máy quang phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến (UV-Vis) hãng Shimadzu, cân phân tích độ chính xác 10^{-4} g (Ohaus), máy ly tâm tốc độ cao, và bể điều nhiệt.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quy trình chiết xuất bằng siêu âm UAE tổng quát

Cân chính xác 1,00g bột dược liệu cỏ mực cho vào bình tam giác dung tích 100ml. Thêm dung môi chiết xuất theo tỷ lệ rắn:lỏng là 1:40 (w/v) để đảm bảo dược liệu được ngập hoàn toàn và tạo điều kiện khuếch tán tốt nhất. Đặt hỗn hợp vào bể siêu âm với các thông số nhiệt độ và thời gian được thiết lập theo ma trận thực nghiệm. Sau khi kết thúc quá trình, dịch chiết được làm lạnh nhanh về nhiệt độ phòng bằng nước đá để dừng ngay các phản ứng nhiệt hóa. Lọc dịch chiết qua phễu Buchner bằng giấy lọc chuyên dụng, chiết lỏng lỏng với n-hexan để loại bỏ diệp lục, sau đó dịch lọc được đem đi cô để thu cao khô nhằm xác định hiệu suất chiết sau đó định mức về 50ml để tiến hành phân tích hoạt chất [9, tr.441]

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

2.3.2. Khảo sát đơn yếu tố về dung môi và ứng dụng HSP

Để lựa chọn hệ dung môi tối ưu cho quy trình tối ưu hóa đa biến, bốn loại dung môi với độ phân cực khác nhau được khảo sát: nước, ethanol, acetone và n-hexane. Các thông số chiết được cố định ở nhiệt độ 50°C và thời gian 60 phút [10, tr.86]. Khả năng hòa tan được giải thích thông qua thông số hòa tan Hansen (HSP), bao gồm ba thành phần lực tương tác:

- δD: Lực phân tán (tương tác không phân cực).
- δP: Lực phân cực (tương tác lưỡng cực - lưỡng cực).
- δH: Lực liên kết hydro.

Thông số hòa tan tổng thể δT được tính theo công thức [8, tr.6]:

$\delta T^2=\delta D^2+\delta P^2+\delta H^2$

Dựa trên nguyên tắc "like dissolves like", các dung môi có thông số HSP gần với các hợp chất polyphenol và flavonoid mục tiêu sẽ cho hiệu suất trích ly cao nhất.

2.3.3. Phương pháp định lượng Polyphenol tổng số (TPC)

Hàm lượng phenolic được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu theo phương pháp đo màu. Cơ chế của phản ứng dựa trên việc các hợp chất phenolic oxy hóa thuốc thử (hỗn hợp acid phosphotungstic và acid phosphomolybdic) trong môi trường kiềm (Na_2CO_3) để tạo thành phức chất màu xanh molybdenum-tungsten có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 725nm [11, tr.78]

Xây dựng đường chuẩn: Sử dụng dung dịch acid gallic chuẩn với các nồng độ từ 0,01 đến 0,10 mg/ml.

Xử lý mẫu: 1ml dịch chiết được phản ứng với thuốc thử, sau khi ổn định trong bóng tối 60 phút, tiến hành đo độ hấp thụ (Abs). Hàm lượng TPC được tính theo đơn vị mg đương lượng acid gallic trên mỗi gam cao khô (mg GAE/g).

2.3.4. Phương pháp định lượng Flavonoid tổng số (TFC)

Flavonoid được định lượng bằng phương pháp tạo phức với nhôm clorid ($AlCl_3$) trong môi trường kiềm. Quy trình bắt đầu bằng việc nitrat hóa các vòng thơm của flavonoid bằng $NaNO_2$, sau đó tạo phức màu hồng với $AlCl_3$. Sự hiện diện của $NaOH$ giúp làm đậm màu phức chất và ổn định độ hấp thụ tại bước sóng 510nm [12, tr.258].

Xây dựng đường chuẩn: Sử dụng quercetin làm chất chuẩn với dãy nồng độ từ 0,05 đến 0,90 mg/ml.

Xử lý mẫu: Phản ứng được thực hiện tương tự dãy chuẩn, đo Abs sau 30 phút ổn định. Kết quả được biểu diễn dưới dạng mg đương lượng quercetin trên mỗi gam cao khô (mg QE/g).

2.3.5. Thiết kế thí nghiệm bề mặt đáp ứng (RSM-CCD)

Sau khi xác định được hệ dung môi tốt nhất là hỗn hợp acetone:nước, thiết kế CCD được áp dụng để tối ưu hóa đồng thời 3 yếu tố:

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

Bảng 1. Ma trận mã hóa các thông số ảnh hưởng đến quá trình trích ly polyphenol và flavonoid

Biến khảo sát	Ký hiệu	Đơn vị	Mã hóa				
			-α	-1	0	+1	+ α
Tỷ lệ acetone:nước	A	%	63	70	80	90	97
Thời gian	B	Phút	50	60	75	90	100
Nhiệt độ	C	°C	30	40	55	70	80

Ma trận thiết kế bao gồm 20 thí nghiệm, bao gồm 8 điểm giai thừa ($2k$), 6 điểm trục ($2k$) và 6 điểm tâm để đánh giá sai số thực nghiệm. Các điểm này được lựa chọn dựa trên các nghiên cứu đã được công bố trước đây về tách chiết các nhóm hợp chất polyphenol và flavonoid [13, tr.15553-15554] [14, tr.3-5]. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Design-Expert v..12 và phân tích phương sai (ANOVA) để xác định ý nghĩa thống kê của các biến và các tương tác bậc hai.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của dung môi trích ly

Việc lựa chọn dung môi là bước tiên quyết ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế và chất lượng cao chiết. Kết quả khảo sát bốn loại dung môi được trình bày trong bảng dưới đây [8, tr.38].

Bảng 2. Hiệu suất chiết xuất cao khô và hoạt chất theo loại dung môi

Dung môi	δD	δP	δH	Cao khô (g)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
Nước	15,5	16,0	42,3	0,1920	22,678	72,341
Ethanol	15,8	8,8	19,4	0,2041	14,916	45,353
Acetone	15,5	10,4	7,0	0,0191	**34,634**	**142,205**
n-Hexane	14,9	0,0	0,0	0,0265	13,164	23,653

Ethanol và Nước: Cho khối lượng cao khô lớn nhất (lần lượt 0,2041g và 0,1920g). Tuy nhiên, hàm lượng hoạt chất TPC và TFC tinh khiết trong cao lại không cao bằng acetone. Điều này giải thích bởi nước và ethanol có tính phân cực mạnh, hòa tan được rất nhiều nhóm chất tạp như đường, pectin, acid hữu cơ và các protein tan trong nước, dẫn đến việc "pha loãng" nồng độ polyphenol và flavonoid trong tổng khối lượng cao thu được.

Acetone: Mặc dù lượng cao khô thu được thấp nhất, nhưng acetone lại cho thấy tính chọn lọc tuyệt vời đối với các hợp chất phenolic. Giá trị TFC (142,205 mg QE/g) cao gấp hơn 3 lần so với chiết bằng ethanol. Điều này có thể được giải thích thông qua HSP: acetone có lực liên kết hydro (δH=7,0) thấp hơn nhiều so với nước và ethanol, nhưng có lực phân cực (δP=10,4) tương

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

đối cao, rất phù hợp để hòa tan các flavonoid có cấu trúc khung aglycone hoặc các glycoside ít phân cực chiếm ưu thế trong cỏ mực.

n-hexane: Cho hiệu suất thấp nhất vì flavonoid và polyphenol là những hợp chất có chứa các nhóm hydroxyl (-OH), mang tính phân cực, do đó không thể hòa tan tốt trong dung môi hoàn toàn không phân cực như hexane.

Dựa trên kết quả này, hệ dung môi hỗn hợp **Acetone:Nước** được lựa chọn cho các bước tối ưu hóa tiếp theo nhằm kết hợp tính chọn lọc của acetone và khả năng trương nở tế bào, tăng độ phân cực của nước để thu nhận tối đa các dẫn xuất polyphenol khác nhau.

3.3. Tối ưu hóa quy trình bằng thiết kế CCD

Quá trình tối ưu hóa đa biến được thực hiện nhằm tìm ra điểm cân bằng giữa tỷ lệ dung môi, nhiệt độ và thời gian để đạt được hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Bảng 3. Ma trận thực nghiệm CCD và kết quả đáp ứng

Lần chạy	aceton:nước	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (oC)	TPC (mgGAE/g)	TFC (mgQE/g)
1	90	60	70	39,4069	153,568
2	90	90	70	39,2934	148,873
3	70	90	70	35,1868	140,062
4	80	75	55	45,3959	158,328
5	80	75	55	44,4733	156,137
6	80	75	55	46,6171	158,401
7	70	60	70	36,4103	148,458
8	63	75	55	36,7367	148,689
9	90	60	40	38,1725	144,019
10	70	90	40	33,3114	138,082
11	80	75	30	34,795	135,683
12	80	75	55	45,0614	155,349
13	80	75	55	45,5132	156,286
14	80	75	55	45,4983	157,572

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

15	90	90	40	38,6857	151,344
16	80	75	80	36,4055	142,523
17	80	50	55	35,858	149,963
18	80	100	55	33,5021	140,699
19	70	60	40	31,7358	136,738
20	97	75	55	45,5041	156,345

Dữ liệu thực nghiệm cho thấy sự biến thiên rất lớn của hàm lượng hoạt chất theo điều kiện chiết. Đáng chú ý, tại các điểm tâm (ví dụ lần chạy 6: 80% acetone, 75 phút, 55°C), hàm lượng hoạt chất đạt mức cao nhất, gợi ý rằng vùng tối ưu nằm gần trung tâm của không gian khảo sát. Khi nhiệt độ tăng quá cao (80°C) hoặc thời gian quá dài (100 phút), hàm lượng TPC và TFC đều có xu hướng giảm mạnh. Điều này minh chứng cho tính nhạy cảm nhiệt của các hợp chất phenolic; nhiệt độ cao và siêu âm kéo dài có thể gây ra hiện tượng oxy hóa hoặc phân hủy cấu trúc vòng thơm của flavonoid.

Về mặt hóa học, bản chất flavonoid là một nhóm thuộc polyphenol, do đó về mặt lý thuyết TPC lớn hơn TFC. Tuy nhiên có một số nguyên nhân khiến cho thực tế có xảy ra hiện tượng TPC nhỏ hơn TFC:

+ Do bản chất hóa học của 2 phản ứng màu khác nhau, chất chuẩn acid gallic (170,12 g/mol) có phân tử khối nhỏ hơn rất nhiều so với quecertin (302,24 g/mol), tạo ra hệ số nhân khác nhau, dẫn đến tăng giá trị số học biểu diễn TFC,

+ Cỏ mực giàu các chất flavonoid dạng aglycone và các dẫn chất coumarin như wedelolactone. Các chất này rất nhạy với thuốc thử Al^{3+}, tạo phức bền và hấp thụ quang phổ mạnh ở bước sóng 510nm. Trong khi đó, cấu trúc cồng kềnh này cản trở thuốc thử Folin ciocalteu tiếp cận các nhóm chức có khả năng thực hiện phản ứng khử. Do đó tín hiệu của TPC có thể thấp hơn thực tế.

+ Phương pháp UAE với hệ dung môi aceton:nước làm tăng tính chọn lọc đối với các flavonoid có tính phân cực trung bình, đồng thời hạn chế các tạp chất khử phân cực như đường, acid hữu cơ, dẫn đến giá trị TPC cũng thấp hơn.

3.3.1. Phân tích mô hình cho đáp ứng TPC

Phân tích phương sai (ANOVA) đã xác định mô hình bậc hai (Quadratic) là phù hợp nhất để mô tả sự biến thiên của TPC và TFC.

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

Bảng 4. Kết quả ANOVA cho mô hình hồi quy TPC và TFC

Source	Sum of Squares	F-value	p-value	Sum of Squares	F-value	p-value
	TPC			TFC		
Model	460,39	80,32	< 0,0001	1096,43	30,11	< 0,0001
A-conc	83,00	130,31	< 0,0001	163,59	40,43	< 0,0001
B-time	0,7435	1,17	0,3053	29,10	7,19	0,0230
C-temp	9,05	14,21	0,0037	76,38	18,88	0,0015
AB	0,0003	0,0004	0,9836	11,72	2,90	0,1196
AC	2,77	4,35	0,0636	5,48	1,35	0,2715
BC	1,47	2,30	0,1601	59,19	14,63	0,0033
A^2	33,20	52,13	< 0,0001	33,02	8,16	0,0170
B^2	209,74	329,30	< 0,0001	239,05	59,08	< 0,0001
C^2	175,37	275,34	< 0,0001	568,92	140,60	< 0,0001
Residual	6,37			40,46		
Lack of Fit	3,90	1,58	0,3150	32,43	4,04	0,0759
Pure Error	2,47			8,03		
Cor Total	466,76			1136,89		

Phương trình hồi quy mô tả TPC theo các biến mã hóa:

$$TPC = +15.44 +2.83\ A -0.0619\ B +0.5021\ C -0.0320\ AB +0.0492\ AC +0.1340\ BC -1.48\ A^2 -3.95\ B^2 -3.43\ C^2$$

Hàm lượng TPC chịu ảnh hưởng quyết định bởi nồng độ dung môi (A), kế đến là nhiệt độ (C). Thời gian chiết (B) ít ảnh hưởng tuyến tính nhưng tác động mạnh dưới dạng bậc hai (B^2), chứng minh quy trình đạt tới một điểm bão hòa tối ưu rõ rệt. Sự ảnh hưởng của cả 3 yếu tố lên TPC đều mang tính chất đường cong bậc hai với các đỉnh cực đại nằm trong vùng khảo sát.

Mô hình hồi quy của TFC cũng đạt độ tin cậy rất cao với R^2=0,9644. Điểm đặc biệt trong mô hình TFC là sự xuất hiện của tương tác có ý nghĩa giữa thời gian và nhiệt độ (biến BC với p = 0,0033). Sự tương tác BC có nghĩa là ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết flavonoid phụ thuộc chặt chẽ vào thời gian thực hiện. Ở nhiệt độ cao, nếu kéo dài thời gian siêu âm, tốc độ phân hủy flavonoid diễn ra nhanh hơn tốc độ giải phóng chúng từ tế bào, dẫn đến tổng hàm lượng thu được bị giảm. Ngược lại, ở nhiệt độ thấp, việc kéo dài thời gian có thể giúp cải thiện hiệu suất nhưng không đáng kể do động năng của quá trình hòa tan thấp.

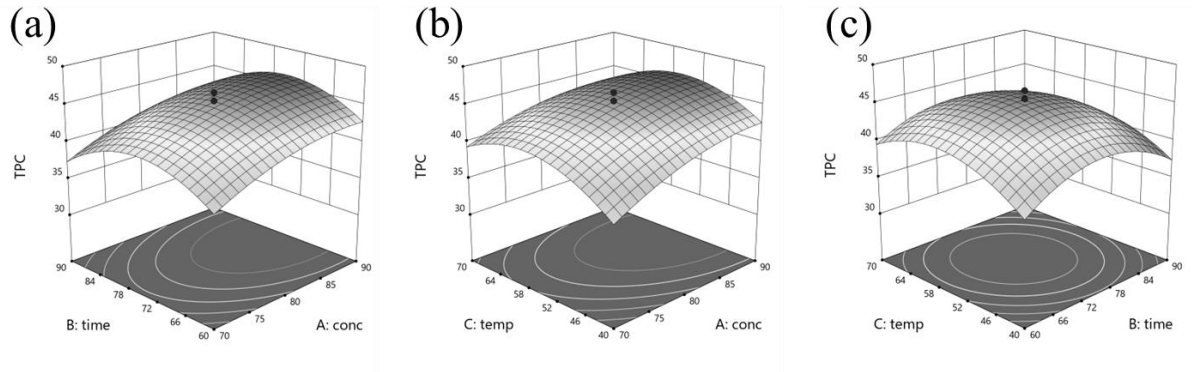
DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

Phương trình hồi quy cho TFC:

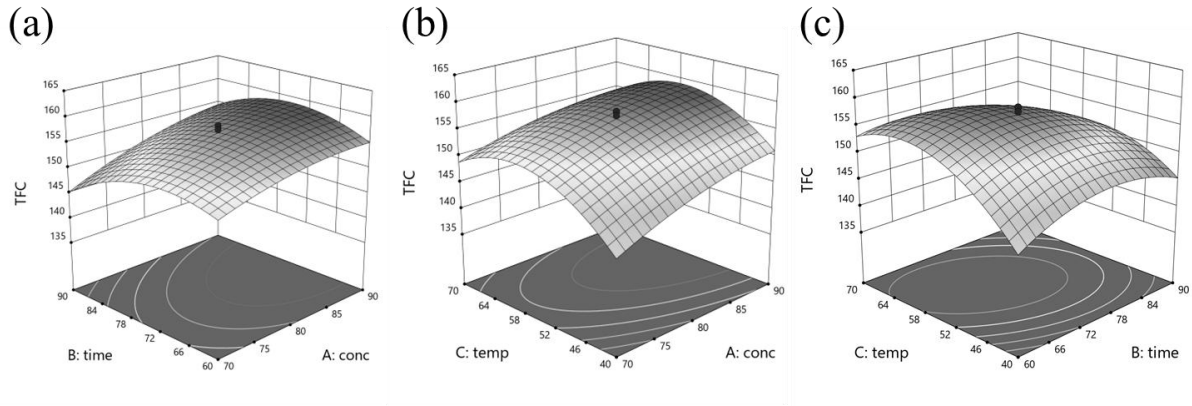
$$TFC = 157{,}00 + 3{,}45A - 1{,}47B + 2{,}37C + 1{,}21AB - 0{,}8277AC - 2{,}72BC - 1{,}49A^2 - 4{,}13B^2 - 6{,}37C^2$$

3.3.3. Phân tích bề mặt đáp ứng 3D

Các đồ thị 3D giúp minh họa sinh động các tương tác giữa các yếu tố.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D biểu diễn ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi:nguyên liệu và nhiệt độ **(a)**, tỉ lệ dung môi:nguyên liệu và thời gian **(b)**, nhiệt độ và thời gian **(c)** với hàm lượng TPC.



Hình 2. Bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D biểu diễn ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi:nguyên liệu và nhiệt độ **(a)**, tỉ lệ dung môi:nguyên liệu và thời gian **(b)**, nhiệt độ và thời gian **(c)** với hàm lượng TFC.

Tỷ lệ Acetone và Thời gian: Khi tỷ lệ acetone tăng từ 70% lên 85%, hàm lượng TPC tăng nhanh nhờ tính chọn lọc dung môi. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ acetone quá cao (> 95%), khả năng thẩm thấu của dung môi vào các cấu trúc tế bào chứa nước bị giảm, làm hiệu suất trích ly đi ngang hoặc giảm nhẹ. Thời gian tối ưu tập trung quanh mốc 75 phút; ngắn hơn thời gian này thì hoạt chất chưa kịp giải phóng hết, dài hơn thì hoạt chất bị phá hủy bởi năng lượng sóng siêu âm (Hình 1).

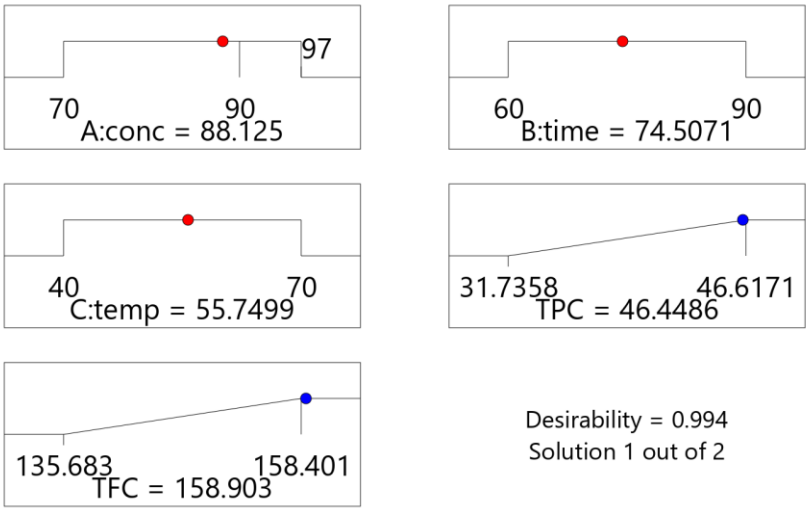
Nhiệt độ và Thời gian: Vùng màu đậm (hàm lượng cao nhất) nằm ở khoảng nhiệt độ 52-60°C. Đây là khoảng nhiệt độ lý tưởng giúp làm giảm độ nhớt của dung môi, tăng hệ số khuếch

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

tán nhưng vẫn nằm dưới ngưỡng phân hủy của các flavonoid aglycone chính trong cỏ mực (Hình 2).

3.4. Xác định điều kiện tối ưu và kiểm chứng thực nghiệm

Sử dụng công cụ tối ưu hóa đa mục tiêu (Desirability function) của phần mềm Design-Expert v.12, nghiên cứu đã xác định được tọa độ điểm tối ưu lý thuyết là nơi cả TPC và TFC đều đạt giá trị cực đại trong vùng khảo sát.



Hình 3. Điều kiện chiết tối ưu

Bảng 3.5. Kiểm chứng kết quả tối ưu bằng thực nghiệm

Lần thử	Hàm lượng TPC (mgGAE/g)	Hàm lượng TFC (mgQE/g)
1	46,19	152,688
2	44,924	152,748
3	46,574	155,159
4	44,73	153,522
5	46,563	154,887
Trung bình	46,196 ± 0,860	153,801± 1,167
Dự đoán	46,449	158,903
ε	1,405%	3,211%

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20

Kết quả thực nghiệm kiểm chứng cho thấy sai lệch rất thấp (dưới 4%), khẳng định độ tin cậy của mô hình toán học đã xây dựng. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng ở quy mô lớn hơn để nâng cao chất lượng cao dược liệu chiết xuất từ cỏ mực.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình chiết siêu âm (UAE) tối ưu hóa hàm lượng polyphenol và flavonoid từ cây Cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.), dựa trên phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với thiết kế tâm xoay tổng hợp (CCD). Mô hình toán học bậc hai thu được đạt độ tương thích cao ($p < 0.0001$, $R^2 > 0.96$). Các thông số kỹ thuật tối ưu của quy trình được xác định bao gồm:

+ Dung môi chiết: Hỗn hợp acetone : nước (88:12, v/v).

+ Nhiệt độ chiết: 56^{o}C.

+ Thời gian chiết siêu âm: 75 phút.

Tại điều kiện tối ưu này, hàm lượng hoạt chất thu được đạt 46,196 mg GAE/g (đối với polyphenol) và 153,801 mg QE/g (đối với flavonoid). Kết quả thực nghiệm kiểm chứng có sai số rất thấp so với lý thuyết, khẳng định mô hình có độ tin cậy cao và hoàn toàn khả thi để ứng dụng chuẩn hóa quy trình sản xuất cao chiết cỏ mực giàu hoạt chất ở quy mô lớn hơn.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Tất Lợi (2002). *Cây thuốc vị thuốc Việt Nam,* NXB Y Học.

[2] Shukla, V., Chaurasia, S., & Singh, R. (2023). *Phytochemical Screening of Eclipta prostrata* (L.). 8(9).

[3] Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243

[4] Feng, L., Zhai, Y.-Y., Xu, J., Yao, W.-F., Cao, Y.-D., Cheng, F.-F., Bao, B.-H., & Zhang, L. (2019). A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Eclipta prostrata (L.)* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 112109.

[5] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.

[6] Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons.

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology

[7] Bezerra, M. A., et al. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76(5), 965-977.

[8] Hansen, C. M. (2007). *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition (2nd a.b).* CRC Press.

[9] Ngọc L. T., & Lê V. T. T. (2025). Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện chiết xuất siêu âm hợp chất flavonoid từ cây lạc tiên *(Passiflora foetida L.)* sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng. *TNU Journal of Science and Technology*, 230(09), 440-447

[10] Nguyen, T. Q., Duong, V. T. N., Tran, T. P., Su, T. K. N., & Nguyen, L. N. T. (2025). Optimization of polyphenol extraction from Eclipta prostrata L. by response surface methodology. *The Journal of Agriculture and Development* 24(2), 84-96

[11] Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 73-99.

[12] Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.

[13] Jing, C.-L., Dong, X.-F., & Tong, J.-M. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method. *Molecules*, 20(9), 15550-15571.

[14] Muruganadam, L., et al. (2017). Optimization studies on extraction of phytocomponents from betel leaves. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 385-393.

DOI: https://doi.org/10.65153/409qnw20
Journal of Science and Technology of East Asia University of Technology