TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN CHIẾT XUẤT BÀI THUỐC SINH MẠCH TÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

NGUYỄN THỊ THU THỦY [1, 4], NGUYỄN VĂN THÀNH [2], HOÀNG THỊ THU HIỀN [3], BÙI ĐÌNH KHẢI [3], QUÁCH THỊ QUỲNH [1], VŨ THỊ LOAN [1], PHẠM THỊ PHƯƠNG LIÊN [1], ĐỖ THỊ THUỲ TRANG [1], ĐÀO NGUYÊN MẠNH [1]

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bài thuốc Sinh mạch tán (SMT) là đơn thuốc thảo dược truyền thống của Trung Quốc, được trình bày trong sách "Nội ngoại thương biện hoặc luận" gồm 3 loại dược liệu: nhân sâm (hoặc đảng sâm), mạch môn và ngũ vị tử [1]. SMT có tác dụng cường tim, trấn tĩnh, cải thiện vi tuần hoàn, chống đông máu và tác dụng phòng ngừa trụy tim mạch do sốc nhiệt. Nghiên cứu dược lý hiện đại của Nien-Lu Wang và cộng sự (2005) đánh giá bài thuốc SMT được chiết xuất từ nhân sâm, mạch môn, ngũ vị tử cho thấy có hiệu quả trong ức chế sinh NO trong não và các cytokine gây viêm trong huyết thanh trên động vật thí nghiệm [2]. Gần đây, một số nghiên cứu đã chứng minh, chế phẩm từ bài thuốc có thể sử dụng hỗ trợ điều trị bệnh tim, phổi [3, 4], có thể kết hợp với các loại thuốc hóa trị liệu để tăng tác dụng chữa bệnh và cải thiện chức năng miễn dịch của bệnh nhân ung thư [5]. SMT là nguồn cung cấp prebiotic và chất chống oxy hóa [6].

SMT là bài thuốc rất phổ biến trong đời sống, tuy nhiên chưa có nhiều công bố về nghiên cứu các điều kiện chiết xuất và khảo sát hoạt tính sinh học từ SMT. Để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học, người ta thường sử dụng phương pháp chiết bằng dung môi. Tuy nhiên, các yếu tố của quá trình chiết xuất như: loại dung môi, nồng độ dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ chiết xuất, thời gian chiết xuất,… có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất [7]. Quá trình tối ưu hóa cần thực hiện nhiều thí nghiệm nhằm lựa chọn các thông số khác nhau. Phương pháp nghiên cứu truyền thống là cách tiếp cận từng yếu tố một, trong đó chỉ một yếu tố có thể thay đổi tại một thời điểm trong khi các yếu tố khác được cố định ở các giá trị không đổi. Tuy nhiên, phương pháp này tốn nhiều thời gian và không thể đánh giá tác động tương tác giữa các yếu tố khác nhau [8]. Các nghiên cứu hiện đại 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 thí nghiệm [8, 9], kết hợp với phương pháp tối ưu hóa, ví dụ phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology - RSM) đưa ra điều kiện tốt nhất để đạt được mục tiêu của thí nghiệm [8, 10].

Trong nghiên cứu này, mục đích thực hiện các thí nghiệm tối ưu hóa các thành phần: dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết xuất cao từ bài thuốc SMT. Nghiên cứu sử dụng phương pháp Box-Behnken để thiết kế và khảo sát các thông số thí nghiệm và kết hợp tối ưu hóa bằng phương pháp RSM, đưa ra điều kiện chiết xuất để có hiệu suất chiết cao và giá trị hoạt tính chống oxy hóa (DPPH %I) cao nhất, từ đó lựa chọn được điều kiện chiết xuất tối ưu đối với bài thuốc SMT.

http://doi.org/10.58334/vrtc.jtst.n35.02

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bài thuốc SMT gồm các dược liệu chính: Nhân sâm (*Rhizoma et Radix Ginseng*), Mạch Môn (*Radix Ophiopogonis japonici*), Ngũ vị tử (*Fructus Schisandrae chinensis*), Cát căn (*Radix Puerariae Thomsonii*), Cam thảo (*Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*) được nhập từ Công ty cổ phần dược liệu Indochina với chứng nhận chất lượng kèm theo. Dược liệu 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. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát đơn yếu tố

Mục tiêu của các thí nghiệm là chọn điều kiện thích hợp (dung môi, nhiệt độ và thời gian) để chiết xuất cao từ bài thuốc SMT. Bước đầu của thí nghiệm là nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất chiết cao và hoạt tính chống oxy hóa (DPPH %I). Quá trình chiết xuất được thực hiện bằng cách sử dụng 2 g bột SMT và 60 mL dung môi có nồng độ (v/v) ethanol khác nhau (0-90%). Bình chiết được đặt trong bể nước ổn nhiệt ở nhiệt độ 70^{o}C trong 2 giờ, với tần số lắc là 80 vòng/phút. Bước thứ hai của thí nghiệm là đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết cao và hoạt tính chống oxy hóa. Chiết xuất thô từ SMT được điều chế bằng cách sử dụng dung dịch ethanol 70%. Nhiệt độ chiết thay đổi từ 30 đến 90^{o}C và quá trình chiết được giữ trong 2 giờ. Bước cuối cùng của thí nghiệm là thiết lập thời gian thích hợp cho quy trình chiết xuất. Thời gian chiết xuất dao động từ 0,5 đến 4 giờ ở 70^{o}C với dung dịch ethanol 70% làm dung môi.

2.2.2. Phương pháp tối ưu hóa quy trình chiết xuất

Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết cao từ bài thuốc SMT được thực hiện bằng phương pháp RSM. Ba yếu tố cần khảo sát là: nồng độ ethanol (EtOH, %), nhiệt độ chiết xuất (T, °C) và thời gian chiết suất (Time, h). Các mức của các tham số độc lập được dựa trên kết quả thử nghiệm sơ bộ. Sử dụng phương pháp Box-Behnken, phần mềm tự động tính toán và lựa chọn 17 thí nghiệm tương ứng. Phạm vi và giá trị của các biến độc lập được trình bày trong Bảng 1. Dữ liệu thực nghiệm được khớp với các mô hình đa thức bậc hai, biểu thị hiệu suất chiết cao và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH %I (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là một hàm của các biến độc lập như sau:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i Y_j \tag{1}$$

Trong đó Y là các thông số đầu ra (hiệu suất chiết cao (PE) và phần trăm ức chế gốc tự do DPPH %I); X_i, X_j là các yếu tố đầu vào (%EtOH, T hoặc Time); β_0, β_i, β_{ii}, β_{ij} là các hệ số tương quan. 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) dựa trên tiêu chí sai số toàn phần với độ tin cậy 95% (p<0,05) [8-10].

2.2.3. Phương pháp xác định hiệu suất chiết cao

Dịch sau chiết tại các thí nghiệm được sấy khô đến khối lượng không đổi, cân xác định hàm lượng chất thu được. Hiệu suất chiết cao được xác định như sau:

$$\text{Hiệu suất chiết cao (PE)} = m/M \times 100\ \% \quad (2)$$

Trong đó: m là khối lượng chất thu được (g); M là khối lượng dược liệu đem chiết (g)

2.2.4. 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 %I) được tính theo công thức sau:

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

- OD_m: Mật độ quang trung bình của mẫu thử ở nồng độ 30 µg/mL

- OD_{dc}: Mật độ quang trung bình của mẫu đối chứng (không có mẫu thử, chỉ có DPPH, coi như giá trị ức chế 0%)

Giá trị nồng độ ức chế trung bình (IC_{50}) được tính dựa trên đường chuẩn với %I của dải nồng độ thích hợp cho từng mẫu thử.

2.2.5. 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 13 (Stat-Ease, Hoa Kỳ), các công thức được phần mềm đưa ra sẽ tiếp tục xét theo mức độ ưu tiên với giá trị PE và DPPH lớn nhất được lựa chọn. Theo đó sắp xếp giá trị PE và DPPH từ thấp đến cao được chia đều từ mức điểm 1 đến 5 (trong đó 1 từ vị trí 1-20; 2 từ vị trí 21-40; 3 từ vị trí 41-60; 4 từ vị trí 61-80; 5 từ vị trí 81-100 và có giá trị PE và DPPH cao nhất được cộng 1 điểm), lựa chọn công thức có số điểm cao nhất là điều kiện tối chiết tối ưu.

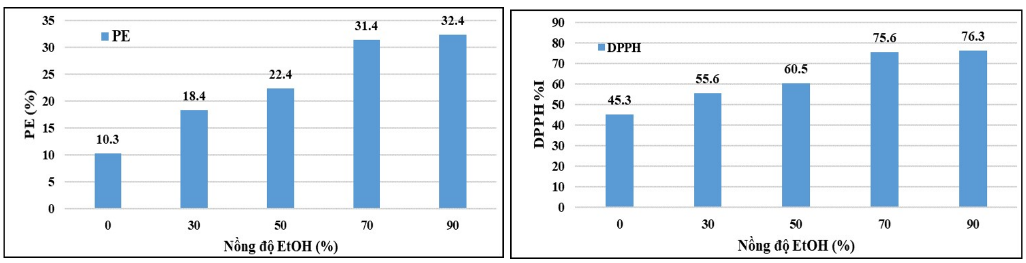
Số liệu các thí nghiệm phân tích được tổng hợp và tính toán trên phần mềm Microsoft Excel (Microsoft, Hoa Kỳ). Sử dụng phần mềm SPSS 20 để thực hiện phương pháp kiểm định giá trị trung bình One-Sample T Test để kiểm tra kết quả thí nghiệm và kết quả tối ưu bằng RSM với $p<0,05$ có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

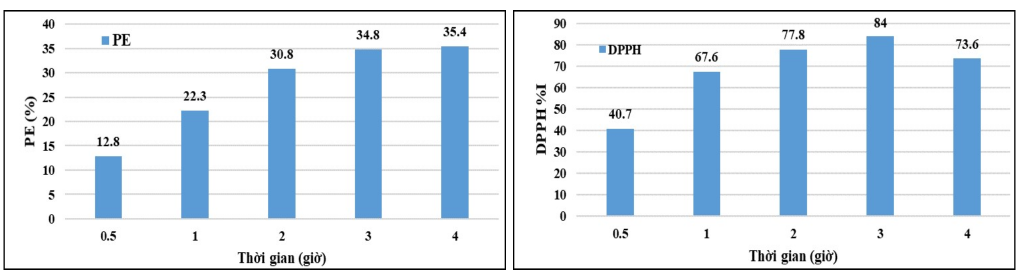
3.1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố

Tác động của nồng độ ethanol khác nhau (0%, 30%, 50%, 70%, 90%) đến PE và DPPH %I được tiến hành ở 70°C trong 2 giờ. Kết quả cho thấy, giá trị PE và DPPH %I được phụ thuộc vào nồng độ ethanol (Hình 1a). Khi tăng giá trị %EtOH từ 0 đến 70%, PE tăng nhanh từ 10,3% lên 31,4%, tương tự, giá trị DPPH %I cũng tăng từ 45,3-75,6%. Khi giá trị EtOH là 90% cả PE và DPPH %I đều có xu hướng tăng nhẹ, nhưng không đáng kể. Xem xét tác động nồng độ trong thiết kế khá phức tạp, do vậy cần khảo sát trên khoảng rộng từ 0-90% cho RSM.

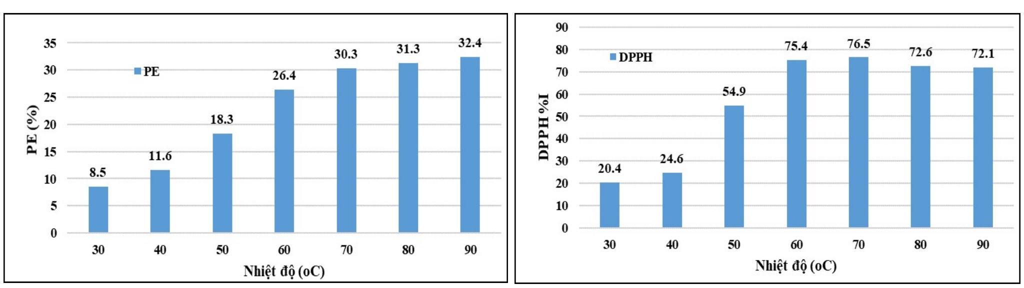
Khi cố định nồng độ ethanol và nhiệt độ, chiết xuất trong khoảng thời gian khác nhau (0,5h; 1h; 2h; 3h; 4h) cho các kết quả về hiệu suất chiết cao và DPPH %I khác biệt. Kết quả Hình 1b cho thấy, thời gian chiết càng lâu thì khối lượng cao chiết được càng lớn, giá trị PE tăng nhanh trong khoảng từ 0,5-3 giờ đầu (từ 12,8% lên 34,8%) và chỉ tăng nhẹ từ 3 giờ đến 4 giờ tiếp theo từ 34,8% lên 35,4%. Trong khi đó, giá trị DPPH %I chỉ tăng trong 3 giờ đầu và giảm khi tăng thời gian chiết từ 3 giờ lên 4 giờ. Rõ ràng, thời gian chiết càng lâu sẽ thu được khối lượng cao chiết càng lớn, tuy nhiên, một số hoạt chất có thể bị phân hủy dưới tác động của nhiệt trong thời gian dài [11]. Do vậy, để đánh giá tối ưu thời gian chiết xuất đồng thời với cả giá trị PE và DPPH %I, tiến hành khảo sát trong khoảng 0,5-4 giờ cho RSM.



(a)



(b)



(c)

Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol (a), nhiệt độ chiết xuất (b) và thời gian chiết xuất (c) tới PE và DPPH %I

Tác động của nhiệt độ đến giá trị PE và DPPH %I được trình bày tại Hình 1c. Theo đó, hiệu suất chiết cao tăng nhanh khi tăng nhiệt độ từ 30°C lên 70°C, khi tăng nhiệt độ trên 70°C, giá trị PE có tăng nhưng không đáng kể từ (30,3% đến 32,4%). Tuy nhiên nhiệt độ cao, hoạt chất được thu hồi thấp hơn bởi sự phân hủy sắc tố tại nhiệt độ không thích hợp [12, 13]. Giá trị DPPH %I giảm khi nhiệt độ >70°C. Ngoài ra, dung môi là ethanol có điểm sôi 80°C, nên ở khoảng nhiệt độ chiết 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 suất chiết. Do vậy, chọn nhiệt độ khảo sát trong khoảng 30-80°C cho RSM.

3.2. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất bằng RSM

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết cao và DPPH %I, có thể thấy, nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian là những yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất SMT. Phương pháp bề mặt đáp ứng theo thiết kế thí nghiệm Box-Behnken với 17 thí nghiệm, kết quả thí nghiệm được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Các thí nghiệm được thiết kế bằng phương pháp Box-Behnken và các giá trị đầu ra tương ứng

STT	%EtOH	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (h)	PE (%)	DPPH %I (30 μg/mL)
1	0	30	2,25	14,52	40,10
2	45	55	2,25	30,58	73,15
3	0	80	2,25	18,46	51,36
4	90	30	2,25	26,58	69,46
5	45	55	2,25	29,26	71,25
6	45	55	2,25	29,57	73,16
7	45	80	0,5	14,26	53,48
8	0	55	0,5	10,73	36,46
9	45	55	2,25	30,22	75,42
10	45	80	4	26,64	76,26
11	45	55	2,25	28,41	73,29
12	0	55	4	16,53	49,22
13	90	55	0,5	16,45	58,46
14	90	55	4	27,55	75,52
15	45	30	0,5	12,36	48,59
16	45	30	4	21,46	67,66
17	90	80	2,25	31,29	63,72

Dựa vào số liệu thu thập tại Bảng 1, phần mềm Design Expert 13 đã đưa ra hai phương trình hồi quy chứng minh mối quan hệ thực nghiệm giữa các giá trị đáp ứng (PE và DPPH %I) và các thông số điều kiện bao gồm nồng độ ethanol (A), nhiệt độ (B) và thời gian (C) như sau:

$$PE = -13{,}19753 + 0{,}24082 \times A + 0{,}55946 \times B + 12{,}58032 \times C + 0{,}00017 \times AB + 0{,}016825 \times AC + 0{,}01874 \times BC - 0{,}00192 \times A^2 - 0{,}00482 \times B^2 - 2{,}58375 \times C^2 \quad (4)$$

$$DPPH\ \%I = -8{,}11122 + 0{,}95326 \times A + 1{,}142362 \times B + 12{,}89112 \times C - 0{,}00378 \times AB + 0{,}01365 \times AC + 0{,}0212 \times BC - 0{,}00585 \times A^2 - 0{,}00841 \times B^2 - 2{,}12269 \times C^2 \quad (5)$$

Trong đó: A là giá trị ethanol (%); B là giá trị nhiệt độ (^oC) và C là thời gian chiết (giờ).

Các phương trình này chỉ ra rằng mô hình bề mặt đáp ứng là đa thức bậc hai (4), (5). Tuy nhiên, việc khám phá và tối ưu hóa có thể tạo ra kết quả kém hoặc sai lệch [7], do vậy, cần phải kiểm tra xem mô hình có phù hợp hay không. Kết quả phân tích ANOVA tại Bảng 2 cho thấy, phương trình hồi quy của PE và DPPH %I đạt được sự tương quan khá tốt với phân tích phương sai có ý nghĩa thống kê ($p<0{,}05$), mô hình này phù hợp và có thể dự đoán chính xác hàm mục tiêu nghiên cứu (PE và DPPH %I). Thêm vào đó, các hệ số tương quan R^2, R^2_{adj} lần lượt là 0,98; 0,96 đối với phương trình PE và 0,98; 0,97 đối với phương trình DPPH %I cho thấy mức độ phù hợp rất cao của mô hình hồi quy đối với số liệu khảo sát thực tế. Giá trị $p > 0{,}05$ đối với chỉ số Lack of Fit cho thấy không có ý nghĩa thống kê và điều đó chỉ ra rằng các mô hình có thể được sử dụng để dự đoán các phản hồi.

Bảng 2. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) của mô hình hồi quy được lựa chọn với biến đầu ra PE và DPPH %I

	Phân tích ANOVA PE				**Phân tích ANOVA DPPH %I**			
	Tổng bình phương	Bình phương trung bình	Kiểm định F	*p*	Tổng bình phương	Bình phương trung bình	Kiểm định F	*p*
Mô hình	840,18	93,35	46,31	< 0,0001	2751,61	305,73	53,28	< 0,0001
A-EtOH	216,63	216,63	107,47	< 0,0001	1012,95	1012,95	176,51	< 0,0001
B-Nhiệt độ	30,93	30,93	15,34	0,0058	45,17	45,17	7,87	0,0263
C-Thời gian	184,13	184,13	91,35	< 0,0001	642,07	642,07	111,89	< 0,0001
AB	0,1482	0,1482	0,0735	0,7941	72,25	72,25	12,59	0,0094

	Phân tích ANOVA PE				**Phân tích ANOVA DPPH %I**			
	Tổng bình phương	Bình phương trung bình	Kiểm định F	*p*	Tổng bình phương	Bình phương trung bình	Kiểm định F	*p*
AC	7,02	7,02	3,48	0,1042	4,62	4,62	0,8055	0,3993
BC	2,69	2,69	1,33	0,2859	3,44	3,44	0,5996	0,4641
A^2	63,4	63,4	31,45	0,0008	590,08	590,08	102,83	< 0,0001
B^2	38,28	38,28	18,99	0,0033	116,31	116,31	20,27	0,0028
C^2	263,63	263,63	130,79	< 0,0001	177,94	177,94	31,01	0,0008
Lack of Fit*	11,23	3,74	5,21	0,0724	31,44	10,48	4,8	0,0818
R^2	0,98				0,98			
Adj-R^2	0,96				0,97			

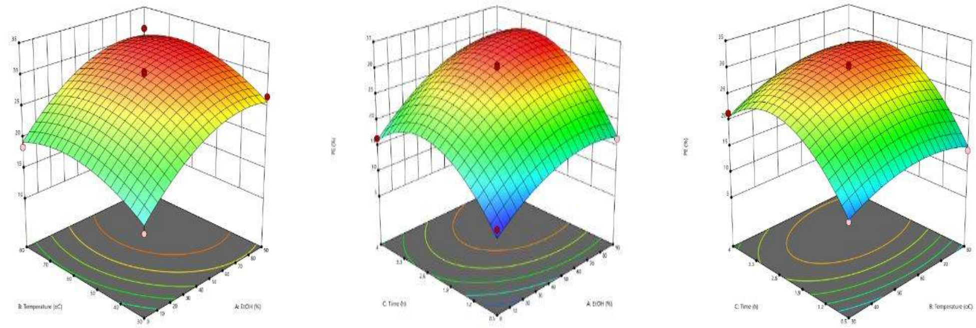
** Lack of Fit: sự thiếu phù hợp.*

Kết quả phân tích cho thấy, các biến A-EtOH, B-Nhiệt độ, C-Thời gian, A^2, B^2, C^2 có tác động đáng kể đến giá trị PE và DPPH %I ($p<0,05$). Ngoài ra biến AB có giá trị $p<0,05$ trong phương trình tuyến tính với giá trị DPPH %I. Dựa trên phân tích ANOVA (Bảng 2), loại bỏ các biến có tác động không đáng kể đến giá trị PE và DPPH %I ($p>0,05$), sau đó có thể viết lại phương trình hồi quy tuyến tính (4) và (5) như sau:

$$PE = -13,19753 + 0,24082 \times A + 0,55946 \times B + 12,58032 \times C - 0,00192 \times A^2 - 0,00482 \times B^2 - 2,58375 \times C^2 \quad (6)$$

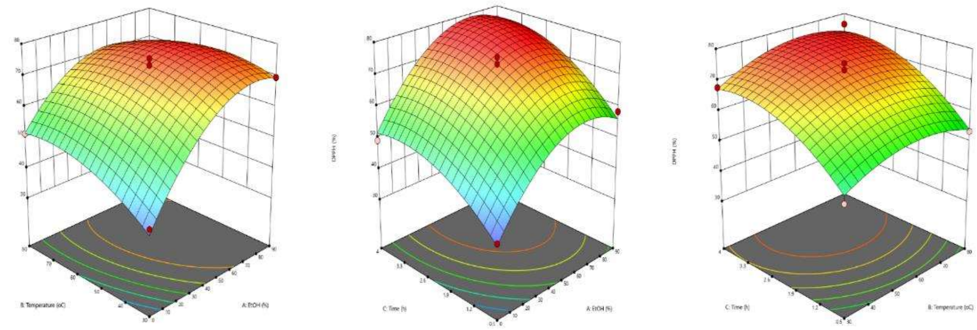
$$DPPH\ \%I = -8,11122 + 0,95326 \times A + 1,142362 \times B + 12,89112 \times C - 0,00378 \times AB - 0,00585 \times A^2 - 0,00841 \times B^2 - 2,12269 \times C^2 \quad (7)$$

Phân tích các biểu đồ bề mặt đáp ứng 3D (Hình 2), ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết xuất, thời gian và sự tương tác của chúng đối với hiệu suất chiết cao. Như có thể thấy trong Bảng 2 và Hình 2, nồng độ ethanol có tác động đáng kể đến hiệu suất chiết cao từ 0 đến 70% ($p < 0,0001$). Đối với nồng độ ethanol cao hơn (>70%) gia tăng giá trị PE không rõ ràng. Giá trị PE giảm khi nồng độ ethanol tăng (>70%) ở nhiệt độ thấp (<60°C) (Hình 2a). Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng khác đối với hiệu quả chiết xuất. Đối với việc chiết xuất PE, nhiệt độ có ảnh hưởng đáng kể ($p < 0,05$ - Bảng 2). Giá trị PE tăng khi nhiệt độ tăng. Một yếu tố tác động khác là thời gian chiết xuất có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết cao ($p < 0,0001$ - Bảng 2). Thời gian chiết xuất tăng từ 0,5 đến 4h và nồng độ ethanol tăng từ 0-90% cho thấy giá trị PE tăng (Hình 2b). Trong khi đó, có sự gia tăng rõ rệt của giá trị PE khi tăng nhiệt độ từ 30-80°C trong khoảng thời gian từ 0,5-3h đầu nhưng lại có xu hướng giảm khi thời gian chiết cao >3h (Hình 2c).



(a) (b) (c)

Hình 2. Các mặt bậc hai biểu diễn mỗi tương quan giữa giá trị PE với các thông số đầu vào (a) nồng độ ethanol và nhiệt độ, (b) nồng độ ethanol và thời gian chiết, (c) thời gian chiết và nhiệt độ



(a) (b) (c)

Hình 3. Các mặt bậc hai biểu diễn mỗi tương quan giữa giá trị DPPH %I với các thông số đầu vào (a) nồng độ ethanol và nhiệt độ, (b) nồng độ ethanol và thời gian chiết, (c) thời gian chiết và nhiệt độ

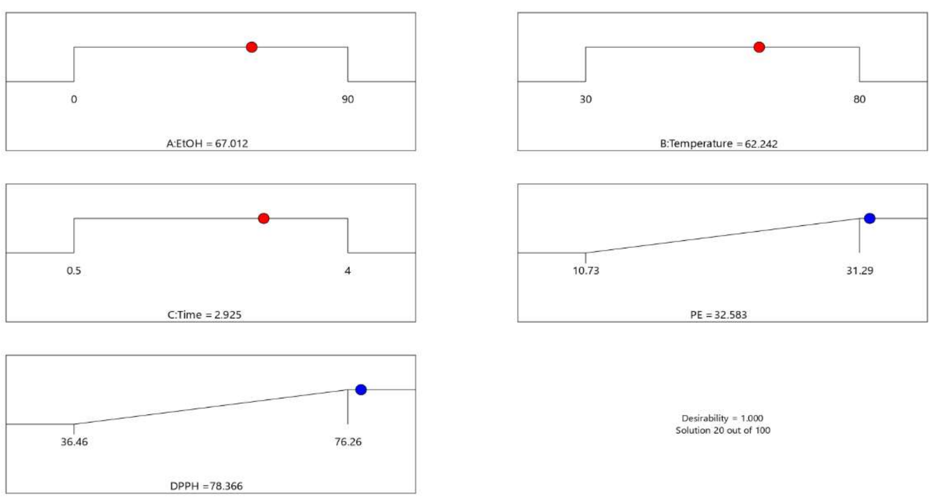
Ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ chiết xuất, thời gian và sự tương tác của chúng đối với giá trị DPPH %I được trình bày thông qua biểu đồ bề mặt đáp ứng 3D tại Hình 3. Theo đó, nồng độ ethanol có ảnh hưởng đáng kể đến giá trị DPPH %I ($p < 0,0001$ - Bảng 2). Giá trị DPPH %I tăng khi nồng độ ethanol từ 0-70% và có xu hướng giảm khi nồng độ >70% (Hình 3a; Hình 3b). Nhiệt độ có ảnh hưởng đến giá trị DPPH %I ($p<0,05$ - Bảng 2). Giá trị DPPH %I tăng khi tăng nhiệt độ (từ 30-60^{o}C) và nồng độ ethanol (từ 0-70%), khi nhiệt độ >60^{o}C giá trị DPPH %I giảm (Hình 3a). Hiệu ứng giữa nồng độ ethanol và thời gian chiết xuất; nhiệt độ và thời gian chiết xuất có sự tương đồng. Trong khoảng thời gian từ 0,5-3h chiết xuất, khi tăng nhiệt độ hoặc nồng độ ethanol, giá trị DPPH %I cũng tăng, tuy nhiên kéo dài thời gian chiết xuất > 3h, giá trị DPPH %I có xu hướng giảm (Hình 3b và Hình 3c). Thời gian chiết xuất có ảnh hưởng đáng kể đến giá trị DPPH %I ($p < 0,0001$ - Bảng 2).

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

Kết quả tính toán lý thuyết bằng phần mềm đưa ra được 100 công thức. Sau khi đánh giá mức độ ưu tiên xác định được 5 công thức có số điểm cao nhất (Bảng 3). Trong đó, công thức số 20 có giá trị PE lớn nhất được cộng 1 điểm theo quy ước và đồng thời có tổng điểm cao nhất. Như vậy, xác định các yếu tố tối ưu cho quá trình chiết cao từ bài thuốc SMT để đạt đồng thời giá trị PE và DPPH %I lớn nhất là nồng độ ethanol 67%; nhiệt độ 62,2°C và thời gian 2,9 giờ. Khi đó, giá trị PE và DPPH %I tối ưu kỳ vọng lần lượt là 32,6% và 78,4% (Hình 4). Để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm lựa chọn điều kiện chiết xuất SMT là ethanol 70%, nhiệt độ 60°C và thời gian 3 giờ.

Bảng 3. Giá trị và mức độ ưu tiên của các công thức được xác định bằng RSM

Công thức	**Điều kiện thí nghiệm**			**Giá trị PE**	**Giá trị DPPH**	**Mức độ ưu tiên**		
	EtOH	Nhiệt độ	Thời gian			PE	DPPH	Tổng
49	65,8	65,2	3,2	32,1	78,3	5	5	10
59	70,5	59,1	2,9	32,3	78,2	5	5	10
73	72,8	61,1	3,2	32,2	78,5	5	5	10
80	66,6	62,8	2,9	32,3	78,1	5	5	10
20	**67**	**62,2**	**2,9**	**32,6**	**78,4**	**6**	**5**	**11**



Hình 4. Điều kiện chiết xuất tối ưu giá trị PE và DPPH %I xác định bằng RSM

Thí nghiệm chiết SMT trong điều kiện tối ưu đã thiết lập (ethanol 70%; nhiệt độ 60°C và thời gian 3 giờ) được lặp lại 20 lần và kết quả được kiểm định bằng phương pháp One-Sample T Test với từng yếu tố PE và DPPH %I. Kết quả chiết xuất thu được trong phòng thí nghiệm giá trị PE là 32,4% và DPPH %I là 78,1% đều không có sự khác biệt đáng kể với kết quả xác định bằng RSM (p>0,05 - Bảng 4). Như vậy, kết quả thực nghiệm với tính toán lý thuyết không có quá nhiều chênh lệch và có thể lấy điều kiện phòng thí nghiệm (ethanol 70%; nhiệt độ 60^{o}C và thời gian 3 giờ) để thực hiện tối ưu quá trình chiết cao từ bài thuốc SMT.

Bảng 4. Kết quả phân tích One-Sample T Test

Chỉ số	Số mẫu	Giá trị trung bình* (%)	Giá trị so sánh** (%)	Sig.***
PE	20	32,4 ±0,5	32,583	0,078
DPPH%I	20	78,1 ±0,6	78,366	0,109

** Giá trị trung bình là giá trị trung bình của các kết quả thực nghiệm với điều kiện chiết xuất SMT là ethanol 70%; nhiệt độ 60^{o}C và thời gian 3 giờ.*

*** Giá trị so sánh là giá trị xác định bằng phương pháp RSM.*

**** Sig. với giá trị p < 0,05 có ý nghĩa thống kê.*

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng được sử dụng để tối ưu điều kiện chiết cao từ bài thuốc SMT. Kết quả đã chứng minh rằng nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian là những yếu tố chính ảnh hưởng đến hiệu suất chiết cao và hoạt tính chống gốc tự do DPPH %I. Kết quả thí nghiệm tương đương với tính toán lý thuyết và các kết quả kiểm định đều có ý nghĩa thống kê cho thấy mô hình tối ưu hóa được lựa chọn là chính xác. Lựa chọn điều kiện chiết cao SMT là 70%; nhiệt độ 60^{o}C và thời gian 3 giờ. Kết quả này là cơ sở để phát triển sản xuất cao SMT ở quy mô lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cheng Y. Y. and Tsai T. H., *Analysis of Sheng-Mai-San, a Ginseng-containing multiple components traditional chinese herbal medicine using liquid chromatography tandem mass spectrometry and physical examination by electron and light microscopies*, Molecules, 2016, **21**(9):1159. DOI: 10.3390/molecules21091159

2. Wang N. L. O., Chang C. K., Liou Y. L., Lin C. L., & Lin M. T., *Shengmai San, a Chinese herbal medicine protects against rat heat stroke by reducing inflammatory cytokines and nitric oxide formation*, Journal of Pharmacological Sciences, 2005, **98**(1):1-7. DOI: 10.1254/jphs.fp0050018

3. Xian S., Yang X., Lee J., Jiang Z., Ye X., Luo L., *A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled clinical study on the efficacy and safety of Shenmai injection in patients with chronic heart failure*, J Ethnopharmacol, 2016, **186**:136-42. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.066

4. Kim M. C., Kim S. J., Choi I. Y., Ki J. Y., Kim D. S., Jeon Y. D., Bae G. E., Li J. S., Wang H. F., Li S. Y., *SHENMAI injection for Chronic pulmonary heart disease: A systematic review and meta-analysis*, J. Altern. Complement. Med., 2011, **17**:579-587. DOI: 10.1089/acm.2010.0354

5. Xiaohui F., Yi W., and Yiyu C., *LC/Ms fingerprinting of Shenmai injection: a novel approach to quality control of herbal medicines*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, **40**:591-7. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.10.036

6. Kang J., Zhao J., He L. F., Li L. X., Zhu Z. K. and Tian M. L., *Extraction, characterization and anti-oxidant activity of polysaccharide from red Panax ginseng and Ophiopogon japonicus waste*, Front. Nutr., 2023, **10**:1183096. DOI: 10.3389/fnut.2023.1183096

7. Omwamba M., Hu Q., *Antioxidant capacity and antioxidative compounds in barley (Hordeum vulgare L.) grain optimized using response surface methodology in hot air roasting*, Eur. Food Res. Technol., 2009**, 229**:907-914. DOI: 10.1007/s00217-009-1128-7

8. Gong Y., Hou Z., Gao Y., Xue Y., Liu X., Liu G., *Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (Tagetes erecta L.) residue using response surface methodology*, Food and Bioproducts Processing, 2012, **90**(1):9-16. DOI:10.1016/j.fbp.2010.12.004

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. DOI: 10.1080/10826068.2013.791629

10. Nguyen Thi Ai Lan, Tran Chi Linh, *Optimization of the extraction process of polyphenols and flavonoids from breadfruit leaves (Artocarpus altilis)*, TNU Journal of Science and Technology, 2022, **227**(10):47-55.

11. Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R., Larondelle Y., *Optimization of extraction conditions of antioxidantphenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón) tubers*, Sep. Purif. Technol., 2007, **55**:217-225. DOI:10.1016/j.seppur.2006.12.005

12. Xu G., X. Ye, Chen J., Liu D., *Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, **55**(2):330-335. DOI: 10.1021/jf062517l

13. Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C, *Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review*, Chinese Medicine, 2018, **13**(1):20. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x

SUMMARY

OPTIMIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS FROM SHENGMAI SAN USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

The aim of the study is to optimize the extraction process from Shengmai San using the Response Surface Methodology (RSM). The factors of ethanol concentration, temperature, and extraction time have an impact on the performance of extraction (PE) and the anti-free radical activity DPPH %I ($p<0.05$). The method used was regression analysis of experimental data, resulting in a second-degree polynomial model with a relatively strong correlation to variance analysis that is statistically significant ($p<0.05$), and high R^2, R^2_{adj} values indicating a reliable and suitable model for reality. The results determined the optimal conditions of RSM as follows: ethanol concentration of 67.0%; temperature of 62.2°C; and extraction time of 2.9 hours, then, the expected optimal values for PE and DPPH %I are 32.6% and 78.4%, respectively. To align with practical application, the optimal conditions for extraction process from the Shengmai San are ethanol concentration of 70%; temperature of 60°C; and extraction time of 3 hours, the PE and DPPH %I values obtained were 32.4% and 78.1%, respectively, with no significant deviation from the results of the RSM model ($p>0.05$).

Keywords: *Shengmai San, response surface methodology, extraction, SMT, bề mặt đáp ứng, chiết xuất.*

Nhận bài ngày 04 tháng 3 năm 2024
Phản biện xong ngày 08 tháng 4 năm 2024
Hoàn thiện ngày 10 tháng 4 năm 2024

(1) Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

(2) Viện KHCN Năng lượng và Môi trường - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(3) Cục Hậu cần Bộ đội Biên phòng

(4) Học viện Khoa học và Công nghệ - 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 Huyên, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội
Điện thoại: 0987556168; Email: ntthuy.vietnga@gmail.com