

ISSN 1859 - 4735



TẠP CHÍ DƯỢC LIỆU

JOURNAL OF MEDICINAL MATERIALS

SỐ 4 - TẬP 31

8/2026

VIỆN DƯỢC LIỆU
NATIONAL INSTITUTE OF MEDICINAL MATERIALS

3B Quang Trung, phường Cửa Nam, thành phố Hà Nội - Việt Nam
TEL: (+84-24) 38247058 FAX: (+84-24) 39348740
Email: tapchiduoclieu@nimm.org.vn; tapchiduoclieu@gmail.com

TẠP CHÍ DƯỢC LIỆU (Bản in và Bản điện tử)

BAN BIÊN TẬP (Nhiệm kỳ 2025-2030)

(Kèm theo Quyết định số 666/QĐ-VDL ngày 24/4/2025 của Viện trưởng Viện Dược liệu)

TỔNG BIÊN TẬP **PGS.TS. Đỗ Thị Hà**

I. Tiểu ban Dược liệu - Dược học cổ truyền

- **PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi - Trưởng Ban**
- PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong - Ủy viên
- GS.TS. Nguyễn Minh Đức - Ủy viên
- GS.TS. Trần Công Luận - Ủy viên
- GS.TS. Won Keun Oh - Ủy viên
- PGS.TS. Trần Hùng - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu - Ủy viên
- PGS.TS. Phương Thiện Thương - Ủy viên
- PGS.TS. Phan Minh Giang - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Nguyễn Thành - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Việt Dũng - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Quốc Huy - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thu Hằng - Ủy viên
- TS. Trần Minh Ngọc - Ủy viên
- TS. Nguyễn Văn Tài - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Đình Chi - Ủy viên
- TS. Nguyễn Tuấn Hiệp - Ủy viên.

II. Tiểu ban Dược lý - Dược lâm sàng

- **PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng - Trưởng Ban**
- PGS.TSKH. Đỗ Trung Đàm - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương - Ủy viên
- GS.TS. William R. Folk - Ủy viên
- PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Thùy Dương - Ủy viên
- PGS.TS. Lê Văn Minh - Ủy viên
- TS. Trần Thị Hiền - Ủy viên.

III. Tiểu ban Nông Sinh

- **TS. Nguyễn Văn Khiêm - Trưởng Ban**
- TS. Phan Thúy Hiền - Ủy viên
- PGS.TS. Nguyễn Văn Tập - Ủy viên
- PGS.TS. Phạm Thanh Huyền - Ủy viên
- GS.TS. Trần Thế Bách - Ủy viên.

IV. Tiểu ban Thư ký - Trị sự

- **PGS.TS. Lê Nguyễn Thành - Trưởng Ban**
- TS. Lê Thị Xoan - Thư ký chuyên môn
- CN. Nguyễn Thị Minh Lộc - Thư ký trị sự.

Trang	NGHIÊN CỨU KHOA HỌC	Page	SCIENTIFIC RESEARCH
257	Thành phần hóa học của cây bồ công anh thấp thu hái tại Việt Nam- Trần Huyền Trang, Đỗ Hoàng Anh, Lê Hồng Văn Anh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Hằng, Vũ Thị Diệp, Nguyễn Trà My, Lê Nguyễn Thành, Đỗ Thị Hà	257	Chemical Constituents from <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. Collected in Vietnam- Tran Huyen Trang, Do Hoang Anh, Le Hong Van Anh, Nguyen Thi Thu, Nguyen Thi Hang, Vu Thi Diep, Nguyen Tra My, Le Nguyen Thanh, Do Thi Ha
265	Linalool-3,7-oxid- β -D-glucopyranosid và các flavonoid từ cúc hoa vàng - Nguyễn Thị Duyên, Trần Thị Tuyết, Bùi Khắc Hiếu, Nguyễn Thị Huế, Bùi Hồng Cường, Lưu Phương Anh, Phạm Văn Công	265	Linalool-3,7-Oxide- β -D-Glucopyranoside and Flavonoids from <i>Chrysanthemum indicum</i> L.- Nguyen Thi Duyen, Tran Thi Tuyet, Bui Khac Hieu, Nguyen Thi Hue, Bui Hong Cuong, Luu Phuong Anh, Pham Van Cong
270	Phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn 5,7-dimethoxyflavon từ thân rễ ngải đen - Nguyễn Văn Bình, Hoàng Thị Thanh Thảo, Lê Quang Thảo, Đỗ Thị Hà, Đoàn Cao Sơn	270	Isolation, Purification and Establishment of 5,7-Dimethoxyflavone as a Reference Standard from <i>Kaempferia parviflora</i> Wall. ex Baker- Nguyen Van Binh, Hoang Thi Thanh Thao, Le Quang Thao, Do Thi Ha, Doan Cao Son
281	Nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời acteosid và isoacteosid trong rễ bạch đồng nữ bằng phương pháp HPLC-DAD - Nguyễn Đình Quân, Nguyễn Lâm Hồng	281	Simultaneous Determination of Acteoside and Isoacteoside in the Roots of <i>Clerodendrum chinense</i> var. <i>simplex</i> by HPLC-DAD - Nguyen Dinh Quan, Nguyen Lam Hong
288	Phát triển phương pháp định lượng 16 acid amin trong củ khoai mỡ tím bằng HILIC-MS/MS - Cao Công Khánh, Nguyễn Quang Hùng, Nguyễn Văn Khoa, Mạc Thị Thanh Hoa, Trần Thị Xuân Lộc, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thị Kiều Anh	288	Development of a Method for the Quantification of 16 Amino Acids in Purple Yam (<i>Dioscorea alata</i> L.) Tubers Using HILIC-MS/MS - Cao Cong Khanh, Nguyen Quang Hung, Nguyen Van Khoa, Mac Thi Thanh Hoa, Tran Thi Xuan Loc, Le Thi Hong Hao, Nguyen Thi Kieu Anh
298	Tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá hồng bằng phương pháp xử lý enzym kết hợp chiết nước - Lê Minh Khuong, Lê Hoàng Vũ, Huỳnh Hồng Nha Uyên, Nguyễn Thị Tố Uyên, Trần Thị Hoài Linh, Trịnh Thị Diệp	298	Optimization of the Extraction Process of Polyphenols and Flavonoids from Persimmon Leaves (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) by Enzyme Pretreatment Combined with Alkaline Aqueous Extraction - Le Minh Khuong, Le Hoang Vu, Huynh Hong Nha Uyen, Nguyen Thi To Uyen, Tran Thi Hoai Linh, Trinh Thi Diep
306	Sàng lọc một số cao chiết dược liệu dựa trên khả năng tăng sinh tế bào nhũ bì nang tóc người (hPDCs) và hoạt tính chống oxy hóa <i>in vitro</i> - Phạm Minh Hiếu, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Phạm Anh Tùng, Phí Đình Uy, Đinh Thị Minh, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Huế, Nghiêm Tiến Chung, Vũ Xuân Bách, Lê Nguyễn Lâm Tùng	306	Screening of some Medicinal Plant Extracts with Hair Growth-Promoting Potential Based on Human Dermal Papilla Cell Proliferation and <i>in vitro</i> Antioxidant Activities - Pham Minh Hieu, Pham Thi Nguyet Hang, Pham Anh Tung, Phi Dinh Uy, Dinh Thi Minh, Nguyen Thi Phuong, Nguyen Thi Hue, Nghiem Tien Chung, Vu Xuan Bach, La Nguyen Lam Tung
314	Đánh giá sàng lọc hoạt tính ức chế xanthin oxidase <i>in vitro</i> của một số cao chiết dược liệu - Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Huế, Lê Thị Xuan, Nguyễn Văn Hiệp, Phí Đình Uy, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phạm Thị Nguyệt Hằng	314	Screening the Anti-Xanthine Oxidase Activities <i>in vitro</i> of some Herbal Extracts - Nguyen Thi Phuong, Nguyen Thi Hue, Le Thi Xuan, Nguyen Van Hiep, Phi Dinh Uy, Nguyen Thi Minh Nguyet, Pham Thi Nguyet Hang
324	Nghiên cứu đánh giá một số hoạt tính liên quan đến mụn trứng cá và chống viêm tại chỗ của các kim tiền trên mô hình thực nghiệm - Đinh Thị Minh, Lê Thị Kim Ngân, Đinh Thị Huyền Trang, Phạm Minh Hiếu, Võ Trần Ngọc Duyên, Nguyễn Ngọc Thanh, Lê Thị Xuan, Phạm Thị Nguyệt Hằng	324	Study on the Anti-Acne and Topical Anti-Inflammatory Effects of <i>Calendula officinalis</i> L. in Experimental Models - Dinh Thi Minh, Le Thi Kim Ngan, Dinh Thi Huyen Trang, Pham Minh Hieu, Vo Tran Ngoc Duyen, Nguyen Ngoc Thanh, Le Thi Xuan, Pham Thi Nguyet Hang
331	Hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm <i>in vitro</i> của lá trà và mối liên quan với hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần - Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Đông Nhi, Võ Thành Nhân, Lê Hồ Ngọc Trân, Lý Hải Triều	331	<i>In vitro</i> Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels Leaves and Correlation with Total Polyphenol and Flavonoid Contents - Nguyen Thi Thu Huong, Nguyen Dong Nhi, Vo Thanh Nhan, Le Ho Ngoc Tran, Ly Hai Trieu
342	Nghiên cứu bào chế hệ tiểu phân nano rutin bằng phương pháp nghiền bi - Hoàng Thị Diệu Hằng, Đào Anh Hoàng, Nguyễn Ngọc Chiến, Nguyễn Thị Sen, Lương Thị Lan, Luyện Bích Phương, Vũ Trường Duy, Trịnh Thị Khánh	342	Formulation and Evaluation of Rutin Nanoparticles Using the Ball Milling Method - Hoang Thi Dieu Hang, Dao Anh Hoang, Nguyen Ngoc Chien, Nguyen Thi Sen, Luong Thi Lan, Luyen Bích Phuong, Vu Truong Duy, Trinh Thi Khanh
351	Bổ sung loài kinh quốc Guguin có giá trị làm thuốc cho khu hệ thực vật Việt Nam - Phạm Ngọc Khánh, Nguyễn Văn Hiếu, Hoàng Diệu Linh	351	An Addition of the Medicinal Species <i>Colquhounia seguinii</i> Vanhot. to the Flora of Vietnam - Pham Ngoc Khanh, Nguyen Van Hieu, Hoang Dieu Linh

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT POLYPHENOL VÀ FLAVONOID TỪ LÁ HỒNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ ENZYM KẾT HỢP CHIẾT NƯỚC

*Lê Minh Khương, Lê Hoàng Vũ, Huỳnh Hồng Nhã Uyên, Nguyễn Thị Tố Uyên, Trần Thị Hoài Linh, Trịnh Thị Điệp**

Trường Đại học Đà Lạt

**Email: dieptt@dlu.edu.vn*

Nhận bài: 09/7/2026

Chấp nhận đăng: 03/8/2026

Tóm tắt

Nghiên cứu nhằm xây dựng và tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá hồng (*Diospyros kaki* Thunb.) bằng nước kết hợp xử lý nguyên liệu với enzym Viscozyme L. Quá trình tối ưu hóa được thực hiện bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Điều kiện tối ưu gồm xử lý với Viscozyme L 0,05% (w/w) ở 39°C trong 2 giờ 48 phút và chiết ở pH 10,2, 94°C trong 30 phút. Thí nghiệm kiểm chứng thu được hàm lượng polyphenol toàn phần đạt 2,75 g GAE/100 g chất khô và flavonoid toàn phần đạt 2,99 g QE/100 g chất khô, phù hợp với giá trị dự đoán của mô hình. Quy trình có tiềm năng ứng dụng ở quy mô pilot.

Từ khóa: *Diospyros kaki; Polyphenol; Flavonoid; Viscozyme L; Chiết xuất bằng nước; Phương pháp bề mặt đáp ứng.*

Summary

Optimization of the Extraction Process of Polyphenols and Flavonoids from Persimmon Leaves (*Diospyros kaki* Thunb.) by Enzyme Pretreatment Combined with Alkaline Aqueous Extraction

An enzyme-assisted aqueous extraction process for polyphenols and flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) leaves was optimized using Response Surface Methodology. The optimal pretreatment conditions were 0.05% (w/w) Viscozyme L, 39°C, and 2 h 48 min, followed by extraction at pH 10.2, 94°C, for 30 min. Under these conditions, the extract contained 2.75 g GAE/100 g dry weight of total polyphenols and 2.99 g QE/100 g dry weight of total flavonoids. The experimental values were consistent with the model predictions, demonstrating the validity of the optimization. The developed process offers a simple, environmentally friendly strategy for producing polyphenol- and flavonoid-rich extracts from persimmon leaves with potential for pilot-scale application.

Keywords: *Diospyros kaki; Polyphenols; Flavonoids; Viscozyme L; Aqueous extraction; Response surface methodology.*

1. Đặt vấn đề

Hồng (*Diospyros kaki* Thunb.) thuộc chi *Diospyros*, họ Ebenaceae, là loài cây ăn quả được trồng phổ biến tại các vùng ôn đới và cận nhiệt đới Đông Á. Bên cạnh giá trị kinh tế của quả, lá hồng từ lâu đã được sử dụng làm dược liệu trong y học cổ truyền của Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản nhờ chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học [1],[2]. Thành phần hóa học của lá hồng bao gồm các hợp chất phenolic (flavonoid, acid phenolic, tannin, stilben, lignan và coumarin), terpenoid và polysaccharid [1],[2],[3],[4], trong đó, polyphenol và flavonoid là hai nhóm hợp chất được quan tâm nhiều nhất do có hàm lượng cao và đóng vai trò quan trọng trong các hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm, bảo vệ thần kinh và hỗ trợ phòng ngừa một số bệnh mạn tính [1],[2],[4],[5],[6],[7],[8],[9]. Hiệu quả chiết xuất các hợp chất polyphenol và flavonoid phụ thuộc đáng kể vào phương pháp chiết và điều kiện xử lý nguyên liệu. Nhiều nghiên cứu đã tối ưu hóa quá trình chiết các hợp chất này từ lá hồng bằng cách khảo sát ảnh hưởng của dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết hoặc phương pháp sấy nguyên liệu [10],[11]. Tuy nhiên, các nghiên

cứu chủ yếu tập trung vào việc tối ưu hóa riêng lẻ các điều kiện chiết ở quy mô phòng thí nghiệm. Việc kết hợp xử lý nguyên liệu bằng enzym nhằm phá vỡ cấu trúc thành tế bào để nâng cao hiệu quả chiết, đồng thời tối ưu hóa toàn bộ quy trình chiết nước kiềm hướng tới khả năng mở rộng ở quy mô pilot, vẫn còn ít được nghiên cứu đối với lá hồng. Trong khi đó, phương pháp chiết bằng kiềm đã giúp thu hồi từ 20–27% polyphenol từ vỏ cây vắn sam [12], đồng thời điều chế được các hợp chất phức phenolic sở hữu hoạt tính sinh học giá trị như kháng HIV, chống viêm và chống oxy hóa từ lá cây Sasa [13]. Tính khả thi trong ứng dụng công nghiệp được khẳng định qua việc triển khai thành công ở quy mô lớn với quy trình chiết kiềm-tủa acid cho rutin đạt hiệu suất cùng độ tinh khiết cao [14].

Lâm Đồng là vùng trồng hồng lớn của Việt Nam với sản lượng quả cao hằng năm. Trong quá trình thu hoạch, lá hồng hầu như chưa được khai thác mặc dù đây là nguồn sinh khối dồi dào và giàu các hợp chất có giá trị sinh học. Việc xây dựng quy trình chiết xuất sử dụng nước kết hợp xử lý enzym không chỉ góp phần tận dụng nguồn phụ phẩm nông nghiệp mà còn phù hợp với xu hướng phát

triển các quy trình công nghệ xanh, an toàn và thân thiện với môi trường. Nghiên cứu này ứng dụng chế phẩm đa enzyme Viscozyme L (phức hợp cellulase, hemicellulase, xylanase và pectinase) để phá vỡ cấu trúc thành tế bào và giải phóng các hợp chất phenolic liên kết. Bằng việc ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM), các điều kiện tiền xử lý Viscozyme L và chiết xuất bằng nước đã được tối ưu hóa hướng tới thu hồi tối đa hàm lượng polyphenol và flavonoid, tạo cơ sở cho việc hoàn thiện và mở rộng quy trình ở quy mô pilot.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là lá hồng (*Diospyros kaki* Thunb.) thu vào 31/10/2023 tại vườn hồng Trại Hành, Đà Lạt, Lâm Đồng và được TS. Lương Văn Dũng, Trung tâm nghiên cứu đa dạng sinh học và Biến đổi khí hậu, Trường Đại học Đà Lạt giám định tên khoa học. Mẫu lá tươi sau khi thu về được sấy khô trong tủ sấy ở 60°C đến độ ẩm < 8%. Mẫu được xay bằng máy xay VN - 2000Y và rây qua hệ thống rây tiêu chuẩn thu được bột mịn có kích thước hạt trong khoảng 0,25-0,50 mm. Mẫu nghiên cứu được lưu tại Khoa Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Đà Lạt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

a) Định lượng polyphenol và flavonoid tổng số

Hàm lượng polyphenol toàn phần (Total Polyphenol Content - TPC) và flavonoid toàn phần (Total Flavonoid Content - TFC) được xác định trực tiếp trên các dịch chiết thu được từ các thí nghiệm xử lý enzym và chiết nước.

TPC được xác định bằng phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck), đối chiếu với chất chuẩn acid gallic (dạng monohydrat, độ tinh khiết 98,0%, HiMedia Labs, India) theo Singleton và cs. [15]. Dung dịch chuẩn acid gallic (10–100 µg/mL) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Mỗi dung dịch chuẩn hoặc mẫu thử (1,0 mL) được phản ứng với 5,0 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%; sau 3–8 phút bổ sung 4,0 mL dung dịch Na₂CO₃ 7,5%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 45 phút và đo độ hấp thụ quang tại 751 nm trên máy quang phổ (UV-Vis-750-Jasco 2019). Kết quả được biểu thị dưới dạng g đương lượng acid gallic (Gallic Acid Equivalent – GAE) trên 100 g nguyên liệu lá hồng khô tuyệt đối (g GAE/100 g DW).

TFC được xác định bằng phương pháp tạo phức với AlCl₃ đối chiếu với chất chuẩn quercetin (độ tinh khiết 97%, công ty TNHH Công nghệ sinh học

Nam Kinh, Trung Quốc) theo quy trình của Chang và cs. [16]. Dung dịch chuẩn quercetin (50–1000 µg/mL) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Mỗi dung dịch chuẩn hoặc mẫu thử (1,0 mL) lần lượt được bổ sung 0,3 mL NaNO₂ 10%, sau 5 phút thêm 0,3 mL AlCl₃ 10%, sau 6 phút bổ sung 2,0 mL NaOH 1 M, định mức đến 10 mL bằng nước cất và đo độ hấp thụ quang tại 510 nm. Kết quả được biểu thị dưới dạng g đương lượng quercetin (Quercetin Equivalent – QE) trên 100 g nguyên liệu lá hồng khô tuyệt đối (g QE/100 g DW). Mỗi phép phân tích được thực hiện ba lần.

b) Khảo sát điều kiện xử lý nguyên liệu bằng enzym và chiết xuất ở pH kiềm

Ảnh hưởng của việc xử lý trước nguyên liệu bằng enzym Viscozyme L (Sigma – Aldrich) và các điều kiện chiết xuất đến hàm lượng polyphenol và flavonoid trong dịch chiết được khảo sát theo phương pháp thay đổi từng yếu tố. Mỗi thí nghiệm sử dụng 2,00 g bột lá hồng với 20 mL nước, chiết ở 90°C. Thí nghiệm thăm dò việc xử lý trước nguyên liệu với Viscozyme L (0,1 mL, 40°C, 2 giờ) được thực hiện song song với mẫu lá không xử lý enzym. Quá trình xử lý Viscozyme L được thực hiện ở pH tự nhiên của hỗn hợp lá hồng trong nước (pH 5,3 - 5,4), đây cũng là khoảng pH tối ưu cho hoạt tính xúc tác của Viscozyme L (pH 4,5 - 5,5) theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Các yếu tố khảo sát sơ bộ điều kiện chiết kiềm gồm pH dung môi (7–12) và thời gian chiết (30–120 phút). pH của dung môi nước được điều chỉnh đến các giá trị khảo sát bằng dung dịch NaOH 1M. Giá trị pH được kiểm soát và đo chính xác bằng thiết bị đo pH để bàn (pH 720 WTW, Đức). Sau khi chiết, dịch chiết được lọc và xác định TPC và TFC theo phương pháp nêu ở Mục 2.2.a.

c) Tối ưu hóa điều kiện xử lý nguyên liệu bằng enzym

Quá trình tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất được thiết kế và phân tích bằng RSM dựa trên ma trận thực nghiệm Box-Behnken theo Myers và cs. [17], sử dụng phần mềm Design-Expert 12. Ba yếu tố khảo sát gồm tỷ lệ enzym (0,01–0,10%), nhiệt độ ủ (30–50°C) và thời gian ủ (2–4 giờ) (Bảng 1). Sau khi kết thúc thời gian ủ xử lý enzym, hỗn hợp được chuyển ngay sang giai đoạn chiết nước ở 90°C. Nhiệt độ cao này vừa đóng vai trò chiết xuất vừa thực hiện bất hoạt hoàn toàn chế phẩm Viscozyme L. Giá trị TPC và TFC của dịch chiết được sử dụng làm các biến đáp ứng để xây dựng mô hình hồi quy và xác định điều kiện xử lý tối ưu.

Bảng 1. Các mức khảo sát trong thiết kế tối ưu hóa quá trình xử lý bằng Viscozyme L.

Ký hiệu	Yếu tố khảo sát	Đơn vị	Mức -1	Mức 0	Mức +1
A	Tỷ lệ enzyme	%	0,01	0,05	0,10
B	Nhiệt độ ủ	°C	30	40	50
C	Thời gian ủ	h	2	3	4

d) Tối ưu hóa điều kiện chiết nước

Sau khi xác định được điều kiện xử lý enzyme tối ưu, quá trình chiết nước được tối ưu bằng RSM với ba yếu tố gồm pH dung môi (7–11), nhiệt độ chiết (75–95 °C) và thời gian chiết (30–90 phút) (Bảng 2). Các thí nghiệm được thực hiện trên nguyên liệu

đã xử lý enzyme theo điều kiện tối ưu. Điều kiện chiết ở nhiệt độ cao đồng thời đóng vai trò bất hoạt enzyme. Giá trị TPC và TFC của dịch chiết được sử dụng làm biến đáp ứng để xây dựng mô hình, xác định điều kiện chiết tối ưu và kiểm chứng mô hình bằng các thí nghiệm xác nhận.

Bảng 2. Các mức khảo sát trong thiết kế tối ưu hóa quá trình chiết nước.

Ký hiệu	Yếu tố khảo sát	Đơn vị	Mức -1	Mức 0	Mức +1
A	pH	–	7	9	11
B	Nhiệt độ chiết	°C	75	85	95
C	Thời gian chiết	phút	30	60	90

e) Xử lý số liệu

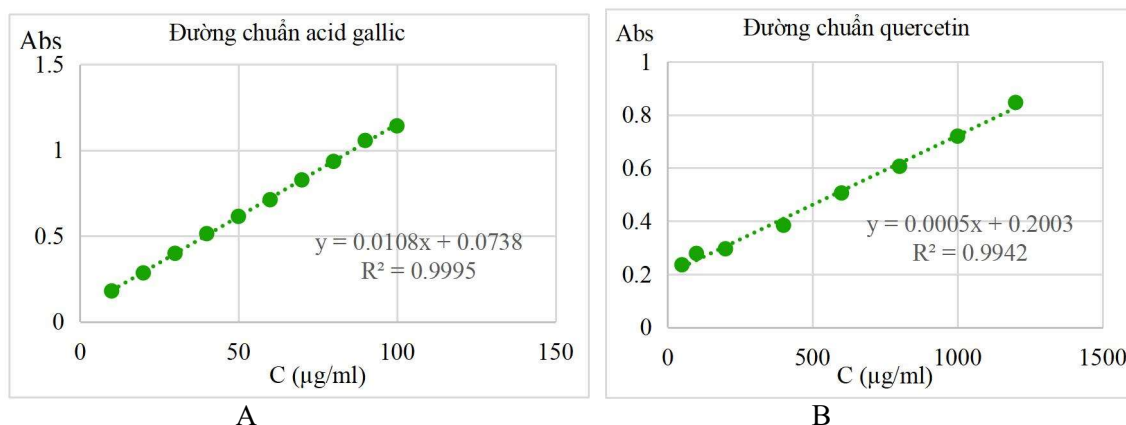
Các số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của ba lần lặp. Phân tích phương sai (ANOVA), xây dựng mô hình hồi quy và tối ưu hóa các điều kiện xử lý enzyme cũng như chiết nước được thực hiện bằng phần mềm Design-Expert 12. Các số liệu được tổng hợp và xử lý bằng Microsoft Excel.

3. Kết quả và Bàn luận**3.1. Thẩm định phương pháp định lượng polyphenol và flavonoid**

Phương pháp phân tích đã được thẩm định độ tin cậy:

Định lượng TPC (theo acid gallic): Khoảng tuyến tính 10–100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9995$); độ lặp lại có độ lệch chuẩn tương đối RSD < 3,1%; độ thu hồi đạt 97,2 - 102,1%.

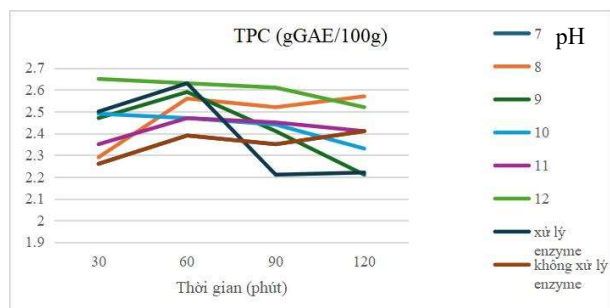
Định lượng TFC (theo quercetin): Khoảng tuyến tính 50–1000 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9942$); độ lặp lại có RSD < 3,8%; độ thu hồi đạt 96,5 - 101,4%.

**Hình 1.** Đồ thị phương trình đường chuẩn acid gallic (A) và quercetin (B)**3.2. Khảo sát điều kiện xử lý nguyên liệu bằng enzyme và chiết xuất ở pH kiềm**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L và pH của nước chiết đến TPC và TFC trong dịch chiết được trình bày ở Hình 2 và Hình 3.

Đối với TPC (Hình 2), xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L trước khi chiết làm tăng hàm lượng polyphenol trong dịch chiết và rút ngắn thời gian đạt giá trị cực đại. Cụ thể, giá trị TPC cao nhất tăng

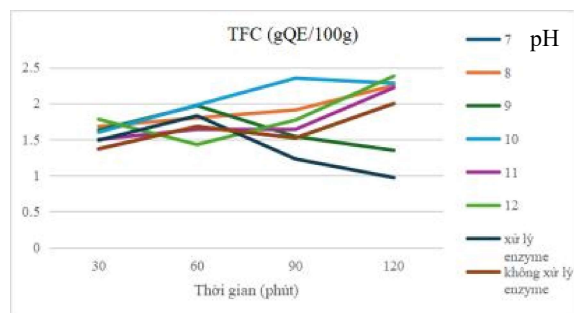
từ 2,41 GAE/100 g chất khô ở mẫu không xử lý enzyme lên 2,63 g GAE/100 g chất khô ở mẫu có xử lý enzyme, đồng thời thời gian đạt giá trị cực đại giảm từ 120 xuống 60 phút. Kết quả này có thể được giải thích do Viscozyme L chứa hỗn hợp các enzyme phân giải thành tế bào thực vật (cellulase, hemicellulase và β -glucanase), giúp phá vỡ cấu trúc thành tế bào, tạo điều kiện giải phóng các hợp chất phenolic liên kết và tăng khả năng khuếch tán của chúng vào dung môi chiết.



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý nguyên liệu bằng enzym và pH của nước chiết đến TPC

Đối với TFC (Hình 3), xử lý bằng Viscozyme L không làm thay đổi đáng kể hàm lượng flavonoid trong dịch chiết. Điều này cho thấy flavonoid trong lá hồng có thể ít bị giới hạn bởi cấu trúc thành tế bào hoặc có thể do enzyme Viscozyme L (chủ yếu phân giải cellulose/hemicellulose) chưa cắt hiệu quả các liên kết đặc thù của flavonoid, hoặc nhiệt độ ủ enzyme chưa tối ưu riêng cho nhóm này, do đó hiệu quả của quá trình tiền xử lý bằng enzyme đối với nhóm hợp chất này không rõ rệt.

Khi sử dụng nước có pH kiềm (8–12), hàm lượng TPC và TFC trong dịch chiết đều cao hơn so với khi chiết ở pH trung tính, đồng thời thời gian đạt giá trị cực đại có xu hướng ngắn hơn. Môi trường kiềm có thể làm tăng độ hòa tan của các hợp



Hình 3. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý nguyên liệu bằng enzym và pH của nước chiết đến TFC

chất phenolic thông qua quá trình ion hóa nhóm hydroxyl phenolic và thúc đẩy sự phá vỡ một phần liên kết giữa các hợp chất phenolic với thành phần của thành tế bào, từ đó nâng cao khả năng khuếch tán vào dung môi.

Từ các kết quả trên, xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L và điều chỉnh pH dung môi chiết được xác định là hai yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình chiết xuất polyphenol và flavonoid từ lá hồng, vì vậy được lựa chọn để khảo sát và tối ưu hóa trong các thí nghiệm tiếp theo bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L

Bảng 3. Ma trận thí nghiệm Box–Behnken và các giá trị đáp ứng dùng để tối ưu hóa điều kiện xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L

STT	A: Tỷ lệ enzyme (%)	B: Nhiệt độ ủ (°C)	C: Thời gian ủ (giờ)	TPC (g GAE/100 g)	TFC (g QE/100 g)
1	0,01	30	3	2,49 ± 0,08	1,95 ± 0,07
2	0,01	40	2	2,61 ± 0,10	1,64 ± 0,07
3	0,01	40	4	2,45 ± 0,09	1,70 ± 0,08
4	0,01	50	3	2,44 ± 0,06	1,42 ± 0,06
5	0,05	30	2	2,39 ± 0,11	2,09 ± 0,06
6	0,05	30	4	2,30 ± 0,03	1,96 ± 0,07
7	0,05	40	3	2,64 ± 0,05	1,54 ± 0,08
8	0,05	40	3	2,53 ± 0,07	1,60 ± 0,07
9	0,05	40	3	2,42 ± 0,10	1,90 ± 0,07
10	0,05	50	2	2,52 ± 0,06	1,96 ± 0,06
11	0,05	50	4	2,30 ± 0,09	2,21 ± 0,07
12	0,10	30	3	2,38 ± 0,05	1,95 ± 0,06
13	0,10	40	2	2,38 ± 0,08	1,31 ± 0,05
14	0,10	40	4	2,03 ± 0,07	1,40 ± 0,05
15	0,10	50	3	2,32 ± 0,10	1,56 ± 0,08

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) và các chỉ số đánh giá mức độ phù hợp của mô hình được trình bày trong Bảng 4. Đối với mô hình dự đoán TPC, hệ số xác định đạt $R^2 = 0,9860$, hệ số xác định hiệu chỉnh (Adjusted $R^2 = 0,9607$) và giá trị Adeq Precision = 21,79, chứng tỏ mô hình mô tả tốt mối quan hệ giữa các yếu tố khảo sát và biến

đáp ứng. Hệ số biến thiên (CV = 1,24%) thấp cho thấy độ chính xác và độ lặp lại của các kết quả thực nghiệm cao. Đối với mô hình dự đoán TFC, giá trị $R^2 = 0,9302$ và Adjusted $R^2 = 0,8046$ cho thấy mô hình có khả năng giải thích phần lớn biến thiên của dữ liệu, mặc dù khả năng dự đoán còn hạn chế do giá trị Predicted R^2 thấp.

Bảng 4. Các hệ số thống kê đánh giá sự phù hợp của mô hình tối ưu hóa điều kiện xử lý trước nguyên liệu bằng Viscozyme L

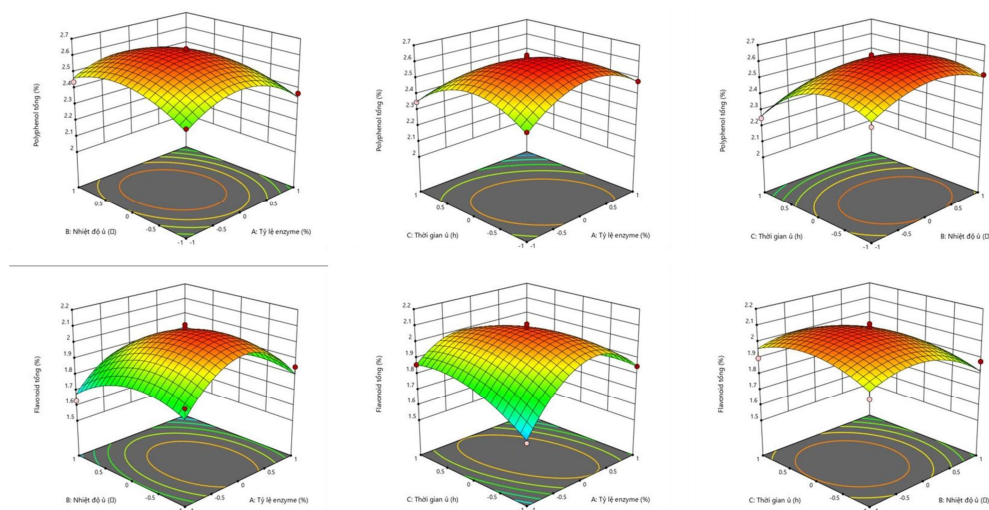
	Phân tích ANOVA TPC	Phân tích ANOVA TFC
Std. Dev.	0,03	0,0727
Mean	2,41	1,84
C.V. %	1,24	3,95
R ²	0,9860	0,9302
Adjusted R ²	0,9607	0,8046
Predicted R ²	0,8126	0,6092
Adeq Precision	21,7934	7,6947

Sau khi phân tích ANOVA, phương trình hồi quy của polyphenol và flavonoid có dạng hàm bậc 2, phần mềm cũng đã đưa ra được phương trình hồi quy thể hiện mối liên hệ giữa các đại lượng như sau:

$$Y_{\text{polyphenol}} = 2,62 - 0,0463A + 0,0125B - 0,1088C - 0,0275AB - 0,085AC - 0,0075BC - 0,1467A^2 - 0,0992B^2 - 0,1467C^2$$

$$Y_{\text{flavonoid}} = 2,08 - 0,0075A - 0,0725B - 0,0025C - 0,02AB - 0,105AC - 0,015BC - 0,2408A^2 - 0,1158B^2 - 0,0858C^2$$

Các bề mặt đáp ứng ba chiều (Hình 4) cho thấy tỷ lệ enzyme, nhiệt độ ủ và thời gian ủ đều ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol và flavonoid thu được trong dịch chiết. Khi tăng tỷ lệ enzyme từ 0,01 lên khoảng 0,05%, hàm lượng polyphenol trong dịch chiết tăng rõ rệt do quá trình thủy phân các polysaccharid của thành tế bào giúp giải phóng các hợp chất phenolic liên kết. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỷ lệ enzyme lên 0,10%, giá trị TPC có xu hướng giảm nhẹ, có thể do hiện tượng bão hòa cơ chất hoặc sự phân hủy một phần các hợp chất phenolic trong điều kiện xử lý kéo dài.



Hình 4. Bề mặt đáp ứng tối ưu hóa điều kiện xử lý trước nguyên liệu bằng Viscozyme L

Nhiệt độ và thời gian xử lý cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình tiền xử lý bằng enzyme. Nhiệt độ thấp làm giảm hoạt tính xúc tác của enzyme, trong khi nhiệt độ quá cao có thể làm giảm độ bền của enzyme và ảnh hưởng đến hiệu quả thủy phân. Tương tự, thời gian xử lý quá ngắn chưa đủ để phá vỡ cấu trúc thành tế bào, còn thời gian quá dài không làm tăng đáng kể lượng hợp chất được giải phóng và có thể làm gia tăng quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic.

Tối ưu hóa đồng thời các biến đáp ứng bằng phần mềm Design-Expert 12 cho thấy điều kiện xử lý nguyên liệu thích hợp là tỷ lệ Viscozyme L 0,05% (w/w), nhiệt độ ủ 39 °C và thời gian ủ 2 giờ 48 phút. Các điều kiện này được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tối ưu hóa quá trình chiết nước ở giai đoạn tiếp theo.

3.4. Tối ưu hóa điều kiện chiết polyphenol và flavonoid

Bảng 5. Ma trận thí nghiệm Box–Behnken và các giá trị đáp ứng dùng để tối ưu hóa điều kiện chiết polyphenol và flavonoid

STT	A: pH	B: Nhiệt độ chiết (°C)	C: Thời gian chiết (phút)	TPC (g GAE/100 g)	TFC (g QE/100 g)
1	7	75	60	1,26 ± 0,05	0,59 ± 0,03
2	7	94	60	1,90 ± 0,08	2,79 ± 0,11
3	7	85	30	1,90 ± 0,09	1,25 ± 0,07
4	7	85	90	1,98 ± 0,10	1,98 ± 0,10
5	9	75	30	1,75 ± 0,06	0,43 ± 0,02
6	9	75	90	1,73 ± 0,08	0,69 ± 0,03
7	9	85	60	2,26 ± 0,07	1,31 ± 0,05
8	9	85	60	2,33 ± 0,08	1,38 ± 0,06
9	9	85	60	2,30 ± 0,11	1,24 ± 0,05
10	9	94	30	2,73 ± 0,10	3,04 ± 0,10
11	9	94	90	2,52 ± 0,09	3,09 ± 0,11
12	11	75	60	1,55 ± 0,08	0,62 ± 0,03
13	11	85	30	2,02 ± 0,10	1,31 ± 0,08
14	11	85	90	2,49 ± 0,07	0,66 ± 0,04
15	11	94	60	2,62 ± 0,10	2,66 ± 0,11

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy pH dung môi, nhiệt độ chiết và thời gian chiết đều ảnh hưởng đến hàm lượng TPC và TFC trong dịch chiết. Các mô hình hồi quy bậc hai thu được có hệ số xác định cao, với $R^2 = 0,9787$ đối với TPC và $R^2 = 0,9792$ đối với TFC (Bảng 6). Giá trị Adeq

Precision lần lượt đạt 16,31 và 14,28, lớn hơn 4, cho thấy mô hình có tín hiệu phù hợp để mô tả quá trình và sử dụng trong tối ưu hóa. Hệ số biến thiên (CV) của hai mô hình lần lượt là 4,90% và 14,81%, phản ánh độ lặp lại chấp nhận được của các kết quả thực nghiệm.

Bảng 6. Các hệ số thống kê đánh giá sự phù hợp của mô hình tối ưu hóa điều kiện chiết

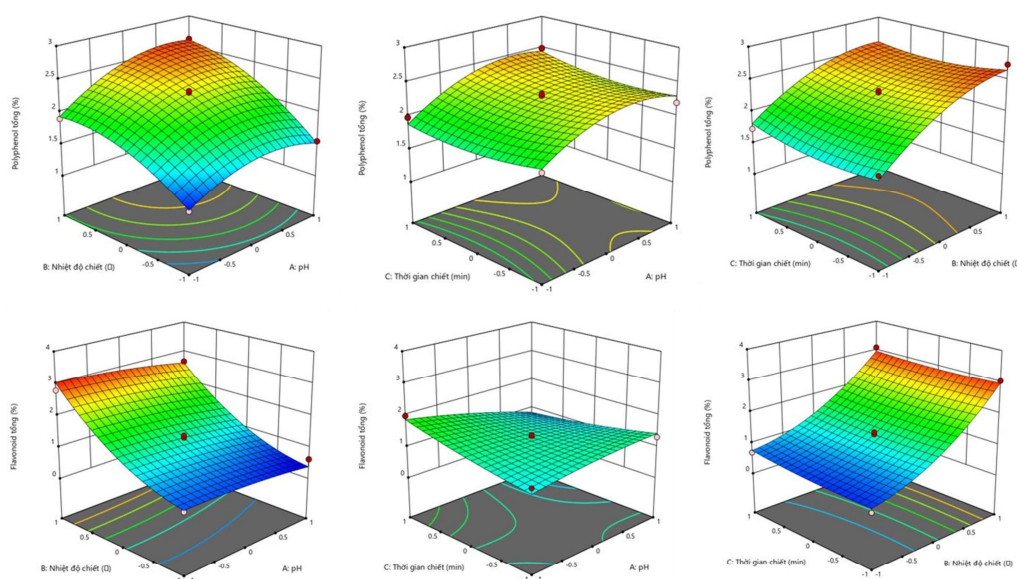
	Phân tích ANOVA TPC	Phân tích ANOVA TFC
Std. Dev.	0,1029	0,2275
Mean	2,1	1,54
C.V. %	4,9	14,81
R^2	0,9787	0,9792
Adjusted R^2	0,9404	0,9418
Predicted R^2	0,6731	0,6782
Adeq Precision	16,3100	14,2813

Sau khi phân tích ANOVA, phương trình hồi quy của polyphenol và flavonoid có dạng hàm bậc 2, phần mềm cũng đã đưa ra được phương trình hồi quy thể hiện mối liên hệ giữa các đại lượng như sau:

$$Y_{\text{polyphenol}} = 2,2967 + 0,2275A + 0,435B + 0,0175C + 0,1075AB + 0,0525AC - 0,0475BC - 0,2521A^2 - 0,2121B^2 + 0,0979C^2$$

$$Y_{\text{flavonoid}} = 1,31 - 0,17A + 1,16B + 0,0488C - 0,04AB - 0,345AC - 0,0525BC - 0,0787A^2 + 0,4338B^2 + 0,0687C^2$$

Các bề mặt đáp ứng (Hình 5) cho thấy sự tương tác giữa các yếu tố khảo sát ảnh hưởng đáng kể đến quá trình chiết. Trong phạm vi nghiên cứu, việc tăng pH và nhiệt độ chiết làm tăng hàm lượng polyphenol và flavonoid trong dịch chiết đến một giá trị tối ưu; sau đó xu hướng tăng không còn rõ rệt hoặc giảm nhẹ. Thời gian chiết có ảnh hưởng nhỏ hơn so với pH và nhiệt độ, cho thấy kéo dài thời gian chiết không mang lại hiệu quả tương ứng.



Hình 5. Bề mặt đáp ứng tối ưu hoá điều kiện chiết polyphenol và flavonoid

Tối ưu hóa đồng thời hai biến đáp ứng bằng phần mềm Design-Expert 12 xác định điều kiện chiết thích hợp là pH 10,2, nhiệt độ 94 °C và thời gian chiết 30 phút. Điều kiện này được lựa chọn để kiểm chứng bằng thực nghiệm.

Thí nghiệm xác nhận tại điều kiện tối ưu cho kết quả TPC và TFC phù hợp với giá trị dự đoán của

mô hình, với độ lặp lại tốt ($RSD < 5\%$) (Bảng 7). Kết quả này chứng tỏ mô hình tối ưu hóa có độ tin cậy và quy trình đề xuất có thể được sử dụng làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình chiết nước polyphenol và flavonoid từ lá hồng ở quy mô lớn hơn.

Bảng 7. Kết quả chiết polyphenol và flavonoid theo điều kiện tối ưu

TPC (g GAE/100 g)		TFC (g QE/100 g)	
Mô hình dự đoán	Thực nghiệm	Mô hình dự đoán	Thực nghiệm
2,726	2,75 ± 0,06 RSD = 2,17%	3,025	2,99 ± 0,09 RSD = 2,93%

Kết quả nghiên cứu cho thấy xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L (0,05%; 39 °C; 2 giờ 48 phút) kết hợp chiết nước ở pH 10,2, 94 °C trong 30 phút đã nâng cao hàm lượng polyphenol và flavonoid trong dịch chiết. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hossain và cs. (2018), trong đó nhiệt độ và thời gian chiết được xác định là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng chiết các hợp chất phenolic từ lá hồng [11]. Tuy nhiên, khác với nghiên cứu trước chỉ tối ưu hóa điều kiện chiết, nghiên cứu này tích hợp thêm bước xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L trước khi chiết nước. Chế phẩm enzyme đa hoạt tính này có khả năng thủy phân các polysaccharid của thành tế bào, tạo điều kiện giải phóng các hợp chất phenolic, từ đó nâng cao hiệu quả chiết. Quy trình sử dụng nước làm

dung môi kết hợp xử lý enzyme là giải pháp thân thiện với môi trường, có tiềm năng mở rộng ở quy mô pilot nhằm khai thác hiệu quả nguồn phụ phẩm lá hồng. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý quá trình chiết xuất ở pH kiềm (pH 10,2) đòi hỏi việc kiểm soát chặt chẽ thời gian chiết ngắn (30 phút) để tránh rủi ro oxy hóa hoặc biến đổi cấu trúc của các monomer flavonoid. Hơn nữa, mặc dù phương pháp đo quang UV-Vis cung cấp công cụ sàng lọc hiệu quả cho quá trình tối ưu hóa diện rộng, việc nghiên cứu ứng dụng quy trình này ở quy mô lớn cần kết hợp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) để định lượng chính xác từng chất marker (như quercetin, kaempferol glycosid) và đánh giá toàn diện độ bền cấu trúc của hoạt chất sau chiết kiềm.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu hóa thành công quy trình chiết xuất các hợp chất polyphenol và flavonoid từ lá hồng (*Diospyros kaki* Thunb.) bằng nước kết hợp xử lý nguyên liệu với enzym Viscozyme L. Kết quả khảo sát cho thấy xử lý nguyên liệu bằng Viscozyme L và điều chỉnh pH dung môi chiết đều góp phần nâng cao khả năng thu nhận các hợp chất polyphenol và flavonoid so với chiết bằng nước ở điều kiện thông thường.

Bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, điều kiện xử lý nguyên liệu tối ưu được xác định là Viscozyme L 0,05% (w/w), nhiệt độ 39 °C và thời gian ủ 2 giờ 48 phút. Trên cơ sở đó, điều kiện chiết nước tối ưu được xác định là pH 10,2, nhiệt độ 94 °C và thời gian chiết 30 phút. Kết quả kiểm chứng thực nghiệm phù hợp với giá trị dự đoán của mô hình, khẳng định độ tin cậy của quá trình tối ưu hóa.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Trường Đại học Đà Lạt cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Xie C., Xie Z., Xu X., Yang D. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 229-240.
2. Hossain A., Shahidi F. (2023). Persimmon leaves: Nutritional, pharmaceutical, and industrial potential - A review. *Plants*, 12(4), 937.
3. Huang S. W., Qiao J. W., Sun X., Gao P. Y., Li L. Z., Liu Q. B., Song S. J. (2016). Secoiridoids and lignans from the leaves of *Diospyros kaki* Thunb. with antioxidant and neuroprotective activities. *Journal of Functional Foods*, 24, 183-195.
4. Nguyen H. V., Nguyen H. T. T., Le N. T., Tran T. Q., Nguyen L. T. T., Mai T. P., Pham P. X., Pham A. V. T., Nguyen H. T. (2025). Triterpenoid from persimmon leaves (*Diospyros kaki* L.f.) exerted anti-type 2 diabetic effects and no toxicity in experimental animals. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 137(2), e70081.
5. Hong C., Wang X., Xu J., Guo J., Peng H., Zhang Y. (2023). A Review: Pharmacological effect of natural compounds in *Diospyros kaki* leaves from the perspective of oxidative stress. *Molecules*, 29(1), 215.
6. Ko H., Huh G., Jung S. H., Kwon H., Jeon Y., Park Y. N., Kim Y. J. (2020). *Diospyros kaki* leaves inhibit HGF/Met signaling-mediated EMT and stemness features in hepatocellular carcinoma. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 142, 111475.
7. Shahat A. A., Ullah R., Alqahtani A. S., Hassanein H. M., Hussein H. A., Mohammed, N. M., Herqash R. N. (2022). Nephroprotective effect of persimmon leaves (*Diospyros kaki* L.f.) against CCl₄-induced renal toxicity in Swiss albino rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(4), 1578-1586.
8. Kim H. S., Suh J. S., Jang Y. K., Ahn S. H., Raja G., Kim J. C., Jung Y., Jung S. H., Kim T. J. (2020). Anti-cancer potential of persimmon (*Diospyros kaki*) leaves via the PDGFR-Rac-JNK pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 18119.
9. Nguyen L. T. T., Le X. T., Pham H. N. T., Van Nguyen T., Nguyen P. T., Van Thi Pham A., Nguyen T. B. T., Matsumoto K. (2023). Therapeutic effects of a standardized-flavonoid *Diospyros kaki* L.f. leaf extract on transient focal cerebral ischemia-induced brain injury in mice. *Journal of Natural Medicines*, 77(3), 544-560.
10. Le N. T., Van Nguyen H., Le G. Q., Hoang T. H. X., Nguyen K. V., Ho D. V., Nguyen H. T. T., Nguyen H. T. (2025). Eco-friendly extraction and recovery of triterpenoids from persimmon leaves (*Diospyros kaki* L.f.) using ultrasound-assisted deep eutectic solvents and macroporous resins. *Analytical methods: Advancing Methods and Applications*, 17(7), 1567-1578.
11. Hossain A., Moon H. K., Kim J.-K. (2018). Effect of pre-treatment and extraction conditions on the antioxidant properties of persimmon (*Diospyros kaki*) leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(11), 2079-2085.
12. Borrega M., Kalliola A., Määtänen M., Borisova A. S., Mikkelsen A., Tamminen T. (2022). Alkaline extraction of polyphenols for valorization of industrial spruce bark. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101129.
13. Sakagami H., Watanabe T., Hoshino T., Suda N., Mori K., Yasui T., Yamauchi N., Kashiwagi H., Gomi T., Oizumi T., Nagai J., Uesawa Y., Takao K., Sugita Y. (2018). Recent progress of basic studies of natural products and their dental application. *Medicines*, 6(1), 4.
14. Liu Z. (2012). *A method for extracting and refining rutin* (Chinese Patent Application No. CN 102718820 A). State Intellectual Property Office of the P.R. China.
15. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
16. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
17. Myers R. H., Montgomery D. C., Anderson-Cook C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments* (4th ed.). John Wiley & Sons.