



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.119

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH LY TRÍCH CAO CHIẾT LÁ XẠ ĐEN (*Celastrus hindsii*) GIÀU POLYPHENOL, FLAVONOID CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ KHÁNG ĐÁI THÁO ĐƯỜNG *in vitro*

Đái Thị Xuân Trang^{1*}, Nguyễn Thúy Tố Minh², Nguyễn Hoàng Duy³, Trần Chí Linh¹ và Phan Ngọc Thùy Ngân⁴

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường THPT Nguyễn Quang Diệu, Châu Thành, Sóc Trăng

³Trường THPT chuyên Nguyễn Quang Diệu, Cao Lãnh, Đồng Tháp

⁴Khoa Sức khỏe, Trường Đại học Cửu Long

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đái Thị Xuân Trang (email: dtxtrang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/04/2022

Ngày nhận bài sửa: 25/04/2022

Ngày duyệt đăng: 26/04/2022

Title:

Optimization of extraction process of *Celastrus hindsii* leaf extract rich in polyphenols, flavonoids with antioxidant and antidiabetic activities *in vitro*

Từ khóa:

Đái tháo đường, flavonoid, kháng oxy hóa, polyphenol, xạ đen

Keywords:

Antidiabetic, antioxidant, *Celastrus hindsii*, flavonoids, polyphenols

ABSTRACT

The surveys were arranged based on the response surface methodology according to the Box-Behnken model in Design Expert 11.0 software to optimize the extraction conditions to maximize the total polyphenol and flavonoid content from the leaves of the *Celastrus hindsii* (CH). The study has extracted polyphenols (120.30±1.15 mg GAE/g extract) and flavonoids (302.39±1.78 mg QE/g extract) optimally by immersion method in ethanol 69% (v/v) 6 hours, material/solvent ratio 1/36 (w/v) and extraction temperature at 60°C. The polyphenol-rich and flavonoid-rich extracts were then studied for their antioxidant and antidiabetic activities *in vitro*. The results showed that, CH leaf extract exhibited potent neutralizing and reducing activities of free radicals in the test: DPPH (EC₅₀=26.73±1.16 µg/mL), NO[•] (EC₅₀=55.43±0.78 µg/mL), ABTS^{•+} (EC₅₀=7.79±0.01 µg/mL), RP (EC₅₀=9.03±0.12 µg/mL), FRAP (EC₅₀=9.20±0.30 µg/mL), and TAC (EC₅₀=59.49±2.61 µg/mL). The CH leaf extract also significantly inhibited α-amylase and α-glucosidase enzyme activities with EC₅₀ values of 156.03±0.43 µg/mL, 26.33±0.76 µg/mL, respectively. This study shows that CH leaf extract, rich in polyphenols and flavonoids, is a promising antioxidant and antidiabetic *in vitro* agent.

TÓM TẮT

Khảo sát được bố trí theo phương pháp đáp ứng bề mặt dựa vào mô hình Box-Behnken trong phần mềm Design Expert 11.0 để tối ưu các điều kiện ly trích polyphenol và flavonoid trong lá xạ đen (LXD). Nghiên cứu đã ly trích được polyphenol (120,30±1,15 mg GAE/g cao chiết), flavonoid (302,39±1,78 mg QE/g cao chiết) tối ưu bằng phương pháp ngâm trong ethanol 69% (v/v) 6 giờ, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/36 (w/v) và nhiệt độ ly trích 60°C. Cao tối ưu LXD giàu polyphenol và flavonoid đã được nghiên cứu hoạt động kháng oxy hóa và kháng đái tháo đường *in vitro*. Kết quả cho thấy, cao tối ưu LXD thể hiện các hoạt động trung hòa và khử hiệu quả các gốc tự do trong thử nghiệm DPPH (EC₅₀=26,73±1,16 µg/mL), NO[•] (EC₅₀=55,43±0,78 µg/mL), ABTS^{•+} (EC₅₀=7,79±0,01 µg/mL), RP (EC₅₀=9,03±0,12 µg/mL) và FRAP (EC₅₀=9,20±0,30 µg/mL) và TAC (EC₅₀=59,49±2,61 µg/mL). Cao tối ưu LXD cũng ức chế đáng kể hoạt động của enzyme α-amylase và α-glucosidase với các giá trị EC₅₀ lần lượt là 156,03±0,43 µg/mL, 26,33±0,76 µg/mL. Nghiên cứu này cho thấy cao tối ưu LXD giàu polyphenol và flavonoid là một tác nhân kháng oxy hóa và kháng đái tháo đường *in vitro* đầy hứa hẹn.

1. GIỚI THIỆU

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh rối loạn chuyển hóa nội tiết có đặc điểm lâm sàng là tăng glucose huyết mãn tính do thiếu insulin, được coi là một nguy cơ khủng hoảng sức khỏe lớn trên toàn thế giới (Wang et al., 2013; Kaur et al., 2016). Bệnh ĐTĐ có thể gây ra tổn thương bệnh lý cho gan, thận và tuyến tụy, với những bất thường đặc trưng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate, lipid và protein (Kuzuya et al., 2002). Các chất tự nhiên có hoạt tính kháng oxy hóa ức chế tổn thương do stress oxy hóa gây ra đã trở thành một chiến lược điều trị để giảm nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ và các biến chứng (Wang et al., 2013). Polyphenol và flavonoid cho thấy một số hoạt động dược lý bao gồm giảm apoptosis, kháng ĐTĐ, bảo vệ tim mạch, bảo vệ gan và các hoạt động tăng sinh tế bào (Han et al., 2007). Polyphenol và flavonoid là một phần không thể thiếu trong chế độ ăn uống của con người và có trong các chất chiết xuất từ thực vật đã được sử dụng trong y học.

Các loài thực vật đang đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ sức khỏe, chống lại bệnh tật cho con người. Các cao chiết khác nhau được ly trích từ cây xạ đen thể hiện các hoạt tính dược lý như: kháng oxy hóa (Ly et al., 2006), kháng virus (Luo et al., 2018), kháng ung thư (Hu et al., 2014). Bên cạnh đó, những nghiên cứu về thành phần hóa học chỉ ra rằng cây xạ đen có chứa alkaloid, flavonoid, phenol, steroid và triterpen (Cianciosi et al., 2005; Pham et al., 2020). Các nghiên cứu về hoạt tính kháng oxy hóa và kháng ĐTĐ *in vitro* ở Việt Nam vẫn còn nhiều hạn chế. Do đó, nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tối ưu hóa điều kiện ly trích polyphenol và flavonoid từ lá xạ đen (LXD) giàu các hoạt tính sinh học.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

LXD được thu mua vào tháng 09 năm 2020, tại tỉnh Hòa Bình. Mẫu được xử lý và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Phát triển Dược liệu của bộ môn Sinh học thuộc Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Cây xạ đen được xác định dựa vào đặc điểm hình thái cơ quan sinh dưỡng và sinh sản theo hệ thống phân loại Cây cỏ Việt Nam (Hộ, 2003).

Thiết bị: máy ly tâm lạnh (Mikro 12-24, Hettich, Đức), cân phân tích (AB104-S, Mettler Toledo, Thụy Sĩ), tủ sấy (BE 200, Memmert, Đức), bể ủ (Mettmert, Đức), máy vortex (ZX3, Velp, Ý),

micropipette (Thermo Labsystems), máy đo quang phổ (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan), máy cô quay chân không (Heidolph, Đức).

Hóa chất: ethanol (Cemaco), trolox (Sigma-Aldrich), $K_2S_2O_8$ (Merck), Na_2CO_3 (Xilong), gallic acid (Merck), quercetin (Merck), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck), $K_3Fe(CN)_6$ (Merck), Cl_3CCOOH (Merck), $FeCl_3$ (Sigma-Aldrich), $NaNO_2$ (Xilong), $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (Xilong), 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich), 2,2-azino-bis (3-ethylbanzthiazoline-6-sulphonic acid (Germany), 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (Sigma-Aldrich), $NH_4Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (Xilong), dimethyl sulfoxide (Merck), enzyme α -amylase (Sigma-Aldrich), enzyme α -glucosidase (Sigma-Aldrich), acarbose (Sigma-Aldrich) và một số hóa chất khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều chế bột dược liệu LXD

LXD tươi (4800 g) thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. LXD khô (2750 g) được xay nhuyễn thành bột và rây qua rây kích thước hạt 60 mesh (0,25 mm). Bột dược liệu LXD có độ ẩm là $4,25 \pm 0,04\%$ được xác định theo mô tả trong Dược Điển Việt Nam V (Bộ Y Tế, 2018).

2.2.2. Phương pháp định lượng polyphenol và flavonoid

Định lượng polyphenol tổng bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu

Hàm lượng polyphenol được xác định theo mô tả của Singleton et al. (1999). Hỗn hợp phản ứng gồm 250 μ L cao chiết; 250 μ L nước khử ion và 250 μ L thuốc thử Folin-Ciocalteu (25%). Sau 8 phút, 250 μ L dung dịch sodium carbonate 10% đã được thêm vào và lắc đều. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 765 nM sau khi ủ 30 phút ở 40°C. Hàm lượng polyphenol được xác định tương đương miligam gallic acid trên mỗi gram cao chiết (mg GAE/g cao chiết).

Phương pháp định lượng flavonoid

Hàm lượng flavonoid được xác định theo mô tả của Sultana et al. (2007). Hỗn hợp phản ứng gồm: 200 μ L cao chiết, 200 μ L nước khử ion và 200 μ L $NaNO_2$ (5%) được ủ trong 5 phút. Sau đó, 40 μ L $AlCl_3$ (10%) được thêm vào và ủ trong 6 phút. Tiếp theo, 400 μ L NaOH 1 M được thêm vào hỗn hợp. Thể tích cuối cùng được điều chỉnh thành 1000 μ L bằng nước khử ion và trộn kỹ. Sau 15 phút, độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp được xác định ở bước sóng 510 nM. Hàm lượng flavonoid được xác định

tương đương miligam quercetin trên mỗi gram cao chiết (mg QE/g cao chiết).

2.2.3. *Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đơn đến quá trình ly trích cao chiết LXĐ giàu polyphenol và flavonoid*

Tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi: Bột dược liệu LXĐ được ngâm với các tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi lần lượt là: 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35 và 1/40 (w/v). Các yếu tố thời gian ly trích 6 giờ với nồng độ ethanol 90% (v/v) và nhiệt độ 30°C được cố định.

Nhiệt độ: Bột dược liệu LXĐ được ngâm ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 40, 50, 60, 70, 80 và 90°C. Các yếu tố nồng độ ethanol 90% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) trong 6 giờ được cố định.

Nồng độ ethanol: Bột dược liệu LXĐ được ngâm với ethanol: 40, 50, 60, 70, 80 90 và 99,5% (v/v). Các yếu tố thời gian ly trích 6 giờ với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) và nhiệt độ 30°C được cố định.

Thời gian: Bột dược liệu LXĐ được ngâm ở các mốc thời gian: 6, 12, 18, 24, 30, 36 và 42 giờ. Các yếu tố nồng độ ethanol 90% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v) và nhiệt độ 30°C được cố định.

Sau đó, dịch ngâm sẽ được lọc và cô đuổi dung môi để thu lấy các cao dược liệu tương ứng. Polyphenol và flavonoid được định lượng trong từng cao dược liệu theo mô tả trong Mục 2.2.2.

2.2.4. *Tối ưu hóa quy trình ly trích cao chiết LXĐ giàu polyphenol và flavonoid*

Quy trình ly trích polyphenol và flavonoid trong bột dược liệu LXĐ được tối ưu hóa theo mô hình Box-behnken trong phần mềm Design Expert 11.0. Thí nghiệm được tiến hành với 3 yếu tố ảnh hưởng. Mô hình kết hợp với một số thí nghiệm ở tâm là những thông số tối ưu xác định được dựa vào các thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố ở trên và một số thí nghiệm cánh tay đòn xoay xung quanh tâm. Trong khảo sát này tổng số nghiệm thức là 17, trong đó có 5 nghiệm thức trung tâm. Dựa vào phương trình hồi quy đa biến, tương tác của các yếu tố ảnh hưởng với hàm mục tiêu và kết quả ước tính đạt được cao nhất của hàm lượng polyphenol, flavonoid tương ứng với các thông số tối ưu để xác định cụ thể quy trình ly trích tối ưu cao chiết LXĐ giàu polyphenol và flavonoid.

2.2.5. *Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và kháng ĐTD in vitro*

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa in vitro

Hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của cao tối ưu LXĐ được đánh giá thông qua 6 phương pháp. Khả năng kháng oxy hóa tổng được đánh giá bằng phương pháp phosphomolybdenum theo mô tả của Prieto et al. (1999). Khả năng trung hòa gốc tự do của cao tối ưu LXĐ được đánh giá lần lượt thông qua phương pháp trung hòa gốc tự do 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺) theo mô tả của Nenadis et al. (2004), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) theo mô tả của Sharma and Bhat (2009) và nitric oxide (NO[•]) theo mô tả của Alisi and Onyeze (2008). Thử nghiệm khả năng khử của cao tối ưu LXĐ được đánh giá dựa vào năng lực khử sắt (Reducing power, RP) theo mô tả của Oyaizu (1986) và tiềm năng khử sắt (Ferric reducing-antioxidant power, FRAP) theo mô tả của Benzie and Strain (1996).

Trong các thử nghiệm kháng oxy hóa ở trên, tinh chất trolox được sử dụng làm đối chứng dương. Các hoạt động kháng oxy hóa của cao tối ưu LXĐ được so sánh với hoạt tính của trolox và cao LXĐ (cao LXĐ là cao được chiết xuất trong điều kiện bình thường theo mô tả của Phụng (2007) và Anh et al. (2021), cụ thể như sau: ethanol 99,5% (v/v), nhiệt độ chiết 30°C, thời gian 24 giờ và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v)) bằng cách tính toán nồng độ (µg/mL) mà cao tối ưu LXĐ, cao LXĐ hoặc trolox có thể khử hoặc trung hòa 50% các gốc tự do (effective concentration of 50%, EC₅₀).

2.2.6. *Khảo sát hoạt tính kháng ĐTD in vitro*

Hoạt tính kháng ĐTD *in vitro* của cao tối ưu LXĐ được đánh giá thông qua khả năng ức chế hoạt động của enzyme α-amylase và α-glucosidase. Trong đó, khả năng ức chế enzyme α-amylase của cao tối ưu LXĐ được thực hiện theo mô tả của Xiao-Ping et al. (2010). Hiệu quả ức chế enzyme α-glucosidase của cao tối ưu LXĐ được xác định theo mô tả của Shai et al. (2011).

Tinh chất acarbose được sử dụng làm đối chứng dương. Khả năng ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase của cao tối ưu LXĐ được so sánh với hoạt tính của acarbose và cao LXĐ bằng cách tính toán nồng độ (µg/mL) mà cao tối ưu LXĐ, cao LXĐ hoặc acarbose có hiệu quả ức chế 50% sự hoạt động của các enzyme (effective concentration of 50%, EC₅₀).

2.3. Xử lý và phân tích số liệu

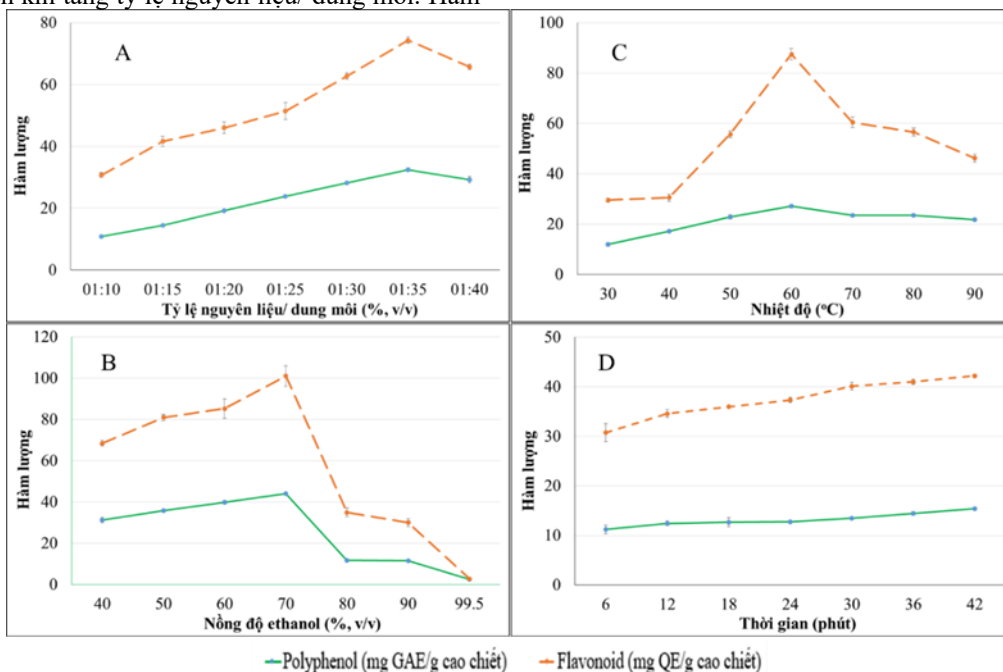
Quy trình tối ưu được thiết kế dựa vào sự hỗ trợ của phần mềm Design Expert 11.0. Số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 (ANOVA-Tukey's) và trình bày dưới dạng $MEAN \pm STDEV$. Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Các thử nghiệm *in vitro* được bố trí lặp lại 3 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn

Hàm lượng polyphenol và flavonoid trong cao LXĐ tăng lên khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi. Hàm

lượng polyphenol và flavonoid tăng dần từ tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/10 (w/v) đến 1/35 (w/v), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (Hình 1A). Sau đó, hàm lượng polyphenol, flavonoid ly trích được bắt đầu giảm khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) từ tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 1/40 (w/v). Điều tương tự cũng ghi nhận được trong nghiên cứu của Xiao et al. (2008) và Thu Dao et al. (2021). Thể tích dung môi lớn dẫn đến sự khuếch tán của nhiệt độ chậm và không đồng nhất trong môi trường phản ứng (Thu Dao et al. (2021).



Hình 1. Hàm lượng polyphenol và flavonoid ly trích từ LXĐ ở các điều kiện khảo sát đơn yếu tố

Ghi chú: A-Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi đến hàm lượng polyphenol và flavonoid; B-Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng polyphenol và flavonoid; C-Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng polyphenol và flavonoid; D-Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng polyphenol và flavonoid.

Nồng độ ethanol có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol và flavonoid (Hình 1B). Hàm lượng polyphenol ly trích từ bột dược liệu LXĐ tăng từ 31,18±1,26 mg GAE/g cao chiết ở nồng độ ethanol 40% lên 44,12±0,35 mg GAE/g cao chiết ở nồng độ ethanol 70%. Hàm lượng polyphenol từ nồng độ ethanol 80% (11,76±0,36 mg GAE/g cao chiết) có xu hướng giảm. Bột dược liệu LXĐ được chiết với ethanol 99,5% cho hàm lượng polyphenol rất thấp chỉ còn 2,46±0,38 mg GAE/g cao chiết, kém 17,93 lần so với ethanol 70%. Hàm lượng flavonoid ly trích từ bột dược liệu LXĐ cũng liên tục tăng khi ly trích với ethanol 40% (68,42±1,31 mg QE/g cao

chiết) đến 70% (101,06±4,95 mg QE/g cao chiết) và hàm lượng flavonoid cũng bắt đầu giảm khi ly trích với ethanol 80% (34,91±2,10 mg QE/g cao chiết). Khi ly trích với ethanol 99,5%, hàm lượng flavonoid thu được rất ít chỉ còn 2,80±0,30 mg QE/g cao chiết, kém hơn ethanol 70% 36,09 lần. Polyphenol và flavonoid trong thực vật phần lớn là những hợp chất phân cực vừa phải, những dung môi có độ phân cực cao như nước hay không phân cực như *n*-hexane thì không thích hợp để ly trích polyphenol với hiệu quả cao. Sự kết hợp của nước với các dung môi hữu cơ khác tạo ra một môi trường có độ phân cực vừa phải

đảm bảo các điều kiện tối ưu để khai thác các polyphenol và flavonoid (Chirinos et al., 2007).

Hàm lượng polyphenol và flavonoid tăng liên tục khi được ly trích ở nhiệt độ từ 30°C (TPC=11,94±0,80 mg GAE/g cao chiết, TFC=29,53±0,90 mg QE/g cao chiết) đến 60°C (TPC=27,19±0,54 mg GAE/g cao chiết, TFC=87,52±2,17 mg QE/g cao chiết) và bắt đầu giảm từ 70°C (TPC=23,51±0,48 mg GAE/g cao chiết, TFC=60,43±2,11 mg QE/g cao chiết). Như vậy, nhiệt độ ly trích (biến số độc lập) được thay đổi từ 30°C đến 90°C, hàm lượng polyphenol và flavonoid (biến phụ thuộc) đạt cực đại ở 60°C, và sau đó giảm dần khi tăng nhiệt độ (Hình 1C). Nguyên nhân dẫn đến giảm hàm lượng polyphenol và flavonoid là do bột dược liệu LXĐ được ngâm ở nhiệt độ cao trong thời gian dài có thể dẫn đến sự phân hủy của các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid. Nghiên cứu của Nuutila et al. (2002) và Şensoy et al. (2006) cho thấy nhiệt độ ly trích cao sẽ dẫn đến sự phân hủy của các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid.

Hàm lượng polyphenol và flavonoid của bột dược liệu LXĐ ly trích ở các mốc thời gian khác nhau được trình bày trong Hình 1D. Hàm lượng polyphenol thu được dao động từ 11,19±0,86 mg

GAE/g cao chiết sau 6 giờ ngâm tăng đến 15,36±0,20 mg GAE/g cao chiết sau 42 giờ ngâm. Hàm lượng flavonoid thu được sau 6 giờ ngâm là 30,75±1,83 mg QE/g cao chiết tăng lên 42,21±0,30 mg QE/g cao chiết sau 42 giờ ngâm. Trong nghiên cứu này, hàm lượng polyphenol và flavonoid tăng dần khi kéo dài thời gian ly trích từ 6 đến 42 giờ. Tuy nhiên, hàm lượng polyphenol và flavonoid ở các mốc thời gian tăng không khác biệt ($p>0,05$).

Nồng độ ethanol, nhiệt độ và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là 3 yếu tố chính ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol và flavonoid ly trích từ LXĐ (Hình 1). Nồng độ ethanol từ 60% đến 80%, nhiệt độ từ 50°C đến 70°C, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi từ 1/30 đến 1/40 (w/v) và thời gian là 6 giờ đã được chọn để đưa vào mô hình tối ưu hóa điều kiện ly trích polyphenol và flavonoid.

3.2. Tối ưu hóa quy trình chiết xuất polyphenol và flavonoid ly trích từ LXĐ

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ethanol, nhiệt độ, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi đến hàm lượng polyphenol và flavonoid trong LXĐ trong thực nghiệm và mô hình dự đoán được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thực nghiệm, dự đoán hàm lượng polyphenol và flavonoid

Thí nghiệm	Các biến độc lập			Hàm lượng polyphenol (mg GAE/g cao chiết)		Hàm lượng flavonoid (mg QE/g cao chiết)	
	A (°C)	B (% v/v)	C (w/v)	Thực nghiệm	Dự đoán	Thực nghiệm	Dự đoán
1	45	60	1/35	61,75 ^h ±0,85	64,86	163,51 ^k ±1,34	165,75
2	65	60	1/35	68,90 ^f ±0,68	67,88	171,84 ^l ±1,02	172,04
3	45	80	1/35	55,23 ⁱ ±1,51	56,25	101,93 ^m ±0,65	101,71
4	65	80	1/35	48,63 ^j ±1,04	45,52	88,68 ^o ±0,62	86,42
5	45	70	1/30	78,11 ^d ±1,10	76,57	209,18 ^f ±1,92	208,42
6	65	70	1/30	70,04 ^e ±0,83	72,63	198,70 ^g ±0,65	199,98
7	45	70	1/40	93,32 ^b ±0,73	90,73	211,70 ^d ±0,66	220,39
8	65	70	1/40	85,43 ^c ±0,76	86,97	219,08 ^e ±1,06	219,82
9	55	60	1/30	66,73 ^g ±0,59	65,16	174,05 ⁱ ±1,59	172,54
10	55	80	1/30	45,03 ^k ±0,85	45,55	98,28 ⁿ ±0,86	99,22
11	55	60	1/40	75,80 ^e ±0,93	75,28	190,92 ^h ±1,66	189,96
12	55	80	1/40	62,37 ^h ±0,81	63,94	112,14 ^l ±1,21	113,62
13	55	70	1/35	117,30 ^a ±0,96	116,88	297,59 ^b ±0,17	297,18
14	55	70	1/35	116,05 ^a ±0,09	116,88	298,07 ^b ±0,09	297,18
15	55	70	1/35	118,85 ^a ±0,09	116,88	299,74 ^a ±0,05	297,18
16	55	70	1/35	114,71 ^a ±1,10	116,88	296,53 ^b ±0,03	297,18
17	55	70	1/35	117,47 ^a ±1,20	116,88	294,05 ^c ±0,03	297,18

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. A là nhiệt độ (°C), B là nồng độ ethanol (% v/v), C là tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi (w/v).

Các thí nghiệm trung tâm (thí nghiệm thứ 13 đến 17) đều cho hàm lượng polyphenol và flavonoid cao hơn các thí nghiệm thức còn lại. Trong đó, thí nghiệm thứ

15 cho hàm lượng polyphenol (118,85±0,09 mg GAE/g cao chiết) và flavonoid (299,74±0,05 mg QE/g cao chiết) cao nhất. So với hàm lượng

polyphenol, flavonoid mà mô hình dự đoán được thì hàm lượng polyphenol thu được ở 17 nghiệm thức không khác so với mô hình thực nghiệm.

Dựa vào các kết quả thu nhận được từ Bảng 1, phần mềm Design Expert 11.0 được sử dụng để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó hàm lượng polyphenol và flavonoid là cao nhất. Từ số liệu thực nghiệm, phương trình hồi quy dạng bậc hai thể hiện hàm lượng polyphenol và flavonoid được thiết lập như sau:

$$Y_{\text{Polyphenol}} = -3275,83725 + 25,58572 \times A + 54,08495 \times B + 42,29115 \times C - 0,03437 \times A \times B + 0,0009 \times A \times C + 0,04135 \times B \times C - 0,19503 \times A^2 - 0,38745 \times B^2 - 0,62592 \times C^2.$$

$$Y_{\text{Flavonoid}} = -8869,8385 + 60,48385 \times A + 162,08908 \times B + 102,27915 \times C - 0,05395 \times A \times B + 0,0893 \times A \times C - 0,01505 \times B \times C - 0,49944 \times A^2 - 1,15762 \times B^2 - 1,50347 \times C^2.$$

Trong đó, Y là hàm lượng polyphenol hoặc flavonoid dự đoán thu được từ LXD, A là yếu tố nhiệt độ (°C), B là yếu tố nồng độ ethanol (% v/v) và C là yếu tố tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (w/v).

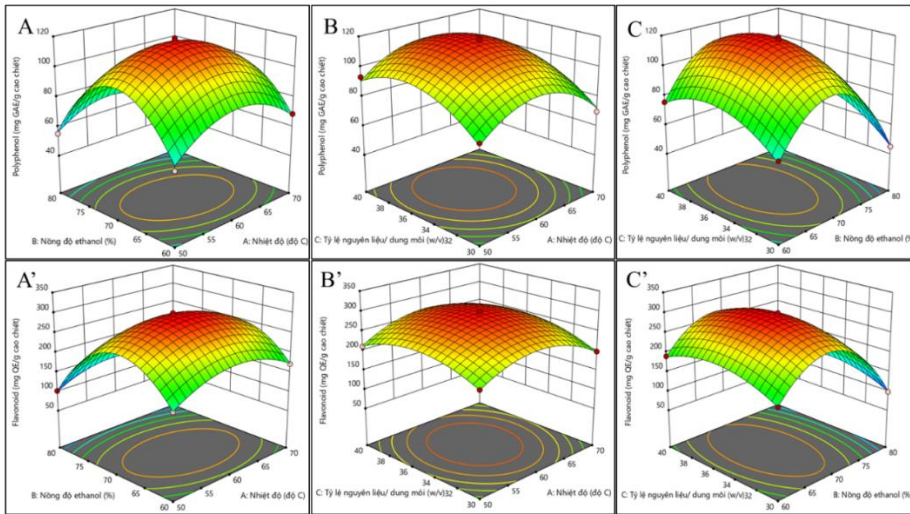
Bảng 2. Phân tích các hệ số tương quan của các yếu tố đến hàm lượng polyphenol

Nguồn	Phân tích ANOVA polyphenol					Phân tích ANOVA flavonoid				
	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value	Sum of squares	Df	Mean square	F-value	p-value
Model	10770,22	9	1196,69	152,96	< 0,0001	90718,93	9	10079,88	1864,72	< 0,0001
A	29,68	1	29,68	3,79	0,0925	8,04	1	8,04	1,49	0,2621
B	479,26	1	479,26	61,26	0,0001	11196,81	1	11196,81	2071,34	< 0,0001
C	406,27	1	406,27	51,93	0,0002	359,52	1	359,52	66,51	< 0,0001
AB	47,27	1	47,27	6,04	0,0436	116,42	1	116,42	21,54	0,0024
AC	0,0081	1	0,0081	0,0010	0,9752	79,74	1	79,74	14,75	0,0064
BC	17,10	1	17,10	2,19	0,1828	2,27	1	2,27	0,4190	0,5381
A ²	1601,55	1	1601,55	204,71	< 0,0001	10502,86	1	10502,86	1942,96	< 0,0001
B ²	6320,90	1	6320,90	807,94	< 0,0001	56424,35	1	56424,35	10438,16	< 0,0001
C ²	1030,99	1	1030,99	131,78	< 0,0001	5948,48	1	5948,48	1100,43	< 0,0001
Residual	54,76	7	7,82			37,84	7	5,41		
Lack of Fit	44,96	3	14,99	6,12	0,0564	20,11	3	6,70	1,51	0,3404
Pure Error	9,80	4	2,45	N=17	CV=3,14%	17,73	4	4,43	N=17	CV=1,15%
Cor Total	10824,98	16	R ² =0,9949	R ² _{Adj} =0,9884	R ² _{Pre} =0,9321	90756,77	16	R ² =0,9996	R ² _{Adj} =0,999	R ² _{Pre} =0,9961

Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình thu được kết quả thể hiện trong Bảng 2. Phương trình hồi quy của polyphenol và flavonoid có dạng hàm bậc 2 và đạt được sự tương quan khá tốt với phân tích phương sai (ANOVA) có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Điều này cho thấy mô hình này phù hợp và có thể dự đoán chính xác hàm mục tiêu nghiên cứu. Phương trình hàm lượng polyphenol (R²=0,9949) và flavonoid (R²=0,9996) cũng cho thấy các thông số có thể giải thích được sự thay đổi của hàm mục tiêu polyphenol, flavonoid với hệ số tương quan khá cao. Xét về hệ số tương quan R², Guan and Yao (2008) cho rằng một mô hình hồi quy đa biến theo phương pháp đáp ứng bề mặt được xem là tốt khi hệ số R² tối thiểu là 0,8. Hơn nữa, giá trị của hệ số biến thiên của polyphenol (CV=3,14%) và

flavonoid (CV=1,15%) cho mô hình đề xuất đều nhỏ hơn 10%, cho thấy độ chính xác và độ tin cậy của quá trình chạy thử nghiệm (Eslami et al., 2016). Các hệ số trong phương trình hồi quy polyphenol đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) ngoại trừ các hệ số A, AC, BC (p>0,05). Tương tự, các hệ số trong phương trình hồi quy flavonoid đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) ngoại trừ các hệ số A, BC (p>0,05).

Các biểu đồ bề mặt đáp ứng 3D được tạo ra bằng cách cố định một yếu tố ở mức 0, đồng thời thay đổi hai yếu tố khác trong phạm vi thăm dò. Các biểu đồ 3D mô tả sự tương tác các yếu tố đến hàm lượng polyphenol và flavonoid được trình bày trong Hình 2.

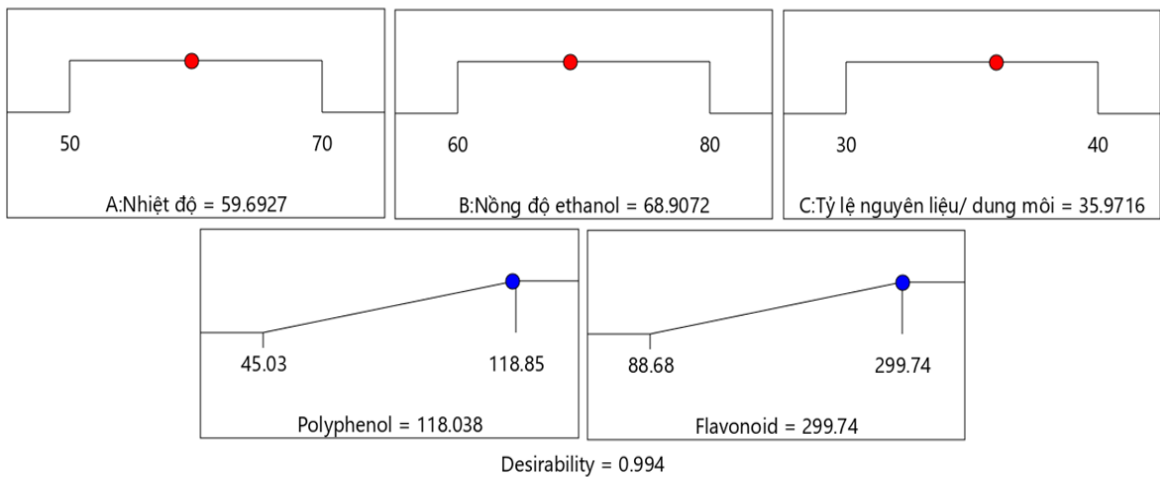


Hình 2. Bề mặt đáp ứng hàm lượng polyphenol và flavonoid của LXĐ

Ghi chú: A, A'-Mô hình tương tác giữa nhiệt độ và nồng độ ethanol ảnh hưởng đến polyphenol và flavonoid; B, B'-Mô hình tương tác giữa nhiệt độ và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng đến polyphenol và flavonoid; C, C'-Mô hình tương tác giữa nồng độ ethanol và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng đến polyphenol và flavonoid.

Dựa trên kết quả phân tích phương án tốt nhất được dự đoán để ly trích polyphenol, flavonoid từ LXĐ được trình bày trong Hình 3. Như vậy, hàm lượng polyphenol, flavonoid từ LXĐ được ly trích tối ưu ở điều kiện nhiệt độ là 59,69°C, nồng độ ethanol là 68,91% và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/35,97 (w/v), khi đó hàm lượng polyphenol, flavonoid thu được đạt cao nhất lần lượt là 118,04 mg GAE/g cao chiết và 299,74 mg QE/g cao chiết.

Trong nghiên cứu này, polyphenol và flavonoid được tiến hành ly trích ở điều kiện nhiệt độ 60°C, nồng độ ethanol là 69% và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/36 (w/v). Kết quả cho thấy, hàm lượng polyphenol, flavonoid thu được khi làm kiểm chứng lần lượt đạt 120,30±1,15 mg GAE/g cao chiết và 302,39±1,78 mg QE/g cao chiết, khác biệt không đáng kể (p>0,05) so với hàm lượng polyphenol, flavonoid mà mô hình tối ưu đề ra. Do đó, mô hình tối ưu thiết kế trong thí nghiệm này được chấp nhận.



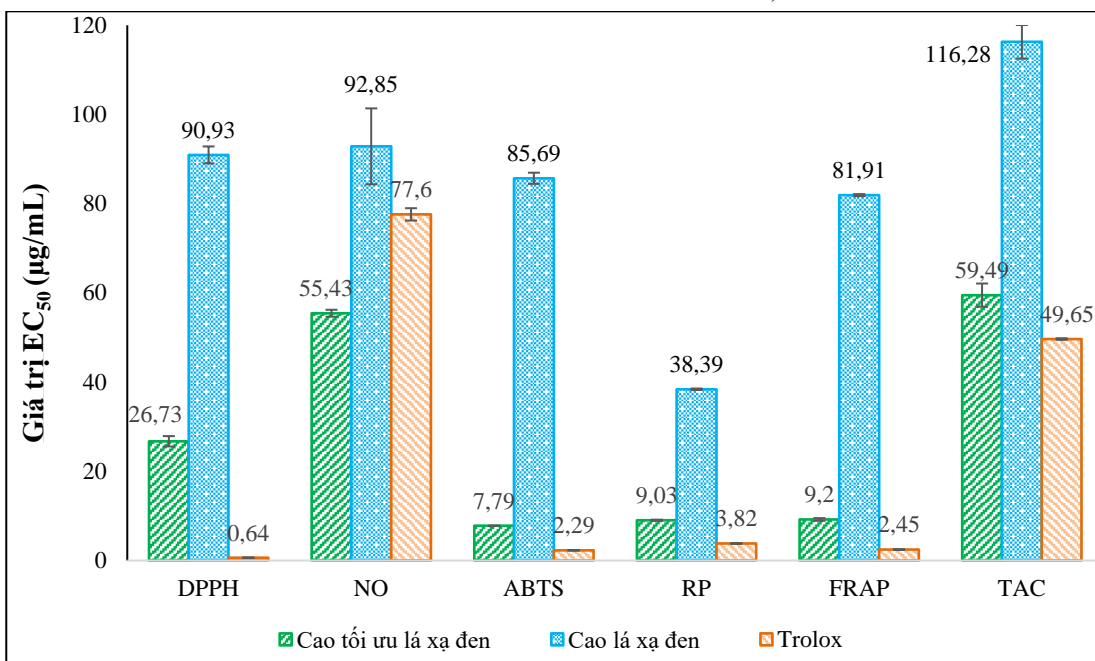
Hình 3. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng polyphenol và flavonoid

3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa và kháng ĐTD in vitro của cao tối ưu LXĐ

3.3.1. Hiệu quả kháng oxy hóa in vitro của cao tối ưu LXĐ

Cao tối ưu LXĐ được đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa bằng cách so sánh với chất chuẩn trolox thông qua việc sử dụng nồng độ (µg/mL) mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết trung hòa hoặc khử được 50% lượng gốc tự do (EC₅₀-half maximal effective concentration). Theo nghiên cứu của Blois (2000), mẫu thử có giá trị EC₅₀ thấp hơn 50 µg/mL là chất kháng oxy hóa rất mạnh; 50-100 µg/mL là chất kháng oxy hóa mạnh và 101-150 µg/mL là chất kháng oxy hóa trung bình trong khi chất kháng oxy

hóa yếu có giá trị EC₅₀>150 µg/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao tối ưu LXĐ có hoạt tính kháng oxy hóa rất mạnh đối với các gốc tự do ở các phương pháp DPPH (EC₅₀=26,73±1,16 µg/mL), ABTS⁺ (EC₅₀=7,79±0,01 µg/mL), RP (EC₅₀=9,03±0,12 µg/mL) và FRAP (EC₅₀=9,20±0,30 µg/mL). Trong khi đó, cao tối ưu LXĐ được đánh giá là có khả năng trung hòa và khử mạnh gốc tự do NO[•] (EC₅₀=55,43±0,78 µg/mL), TAC (EC₅₀=59,49±2,61 µg/mL). Tuy nhiên, cao tối ưu LXĐ có khả năng kháng oxy hóa ở các phương pháp DPPH, ABTS⁺, RP, FRAP và TAC yếu hơn tinh chất trolox lần lượt là 41,77, 3,40, 2,36, 3,76 và 1,20 lần. Đối với gốc tự do NO[•], cao tối ưu LXĐ được xác định mạnh hơn tinh chất trolox 1,40 lần.



Hình 4. Nồng độ trung hòa hoặc khử 50% lượng gốc tự do

Bên cạnh việc so sánh với tinh chất trolox, hoạt tính kháng oxy hóa của cao tối ưu LXĐ cũng được so sánh với cao LXĐ (cao chưa tối ưu). Cao LXĐ được ly trích bằng cách ngâm bột dược liệu trong dung môi ethanol 99,5% (v/v), ở 30°C, 24 giờ với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 (w/v). Qua so sánh có thể thấy, cao tối ưu LXĐ có hoạt tính kháng oxy hóa ở tất cả các phương pháp đều mạnh hơn cao LXĐ. Cụ thể, ở các phương pháp DPPH, ABTS⁺, NO[•], RP, FRAP và TAC, cao tối ưu LXĐ mạnh hơn cao LXĐ lần lượt 3,40, 11, 1,68, 4,25, 8,90 và 1,95 lần.

Trong nghiên cứu của Pham et al. (2020), lá cây xạ đen được tối ưu hóa quy trình ly trích flavonoid bằng phương pháp siêu âm với công suất 130 W,

thời gian chiết 29 phút và nồng độ ethanol 65%. Kết quả cho thấy, cao tối ưu LXĐ trong nghiên cứu của Pham et al. (2020) có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS⁺ với giá trị EC₅₀ lần lượt là 164,85 và 89,05 µg/mL. Trong nghiên cứu này, cao tối ưu LXĐ có hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH (EC₅₀=26,73±1,16 µg/mL) và ABTS⁺ (EC₅₀=7,79±0,01 µg/mL) mạnh hơn cao tối ưu LXĐ trong nghiên cứu của Pham et al. (2020) lần lượt là 6,17 và 11,43 lần. Trong nghiên cứu của Pham et al. (2020), khả năng trung hòa gốc tự do DPPH và ABTS⁺ thấp hơn trong nghiên cứu này có thể là do ảnh hưởng của hàm lượng flavonoid. Trong nghiên cứu này, cao tối ưu LXĐ có hàm lượng flavonoid là 302,39±1,78 mg QE/g cao chiết cao gấp

12,81 lần so với nghiên cứu của Pham et al. (2020). Trong nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu của Pham et al. (2020) về khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cao tối ưu LXĐ kém hơn gốc tự do ABTS^{•+}. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng đã đánh giá đa dạng khả năng kháng oxy hóa của cao tối ưu LXĐ trên nhiều gốc tự do khác nhau.

3.3.2. Hiệu quả kháng đái tháo đường *in vitro* của cao tối ưu LXĐ

Enzyme α -amylase và α -glucosidase được sử dụng trong nghiên cứu này có mối liên quan chặt chẽ về mặt cấu trúc và cơ học với enzyme của con người, vì đây là những enzyme được ly trích từ động vật. Cụ thể, enzyme α -amylase được ly trích từ tụy và enzyme α -glucosidase được ly trích từ ruột non rất thích hợp cho việc bố trí thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng ĐTĐ *in vitro*. Một tác nhân có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase có thể được sử dụng như một nhóm thuốc hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ bằng cách ngăn chặn sự thủy phân nhanh các dạng carbohydrate thành đường đơn giúp kéo dài thời gian hấp thu và do đó kiểm soát glucose huyết (Zhenhua et al., 2014). Do đó, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát khả năng ức chế hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase.

Trong nghiên cứu này, tinh chất acarbose được sử dụng làm chất đối chứng dương để so sánh tác dụng của ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao tối ưu LXĐ. Dựa vào nồng độ mà tại đó cao chiết ức chế được 50% sự hoạt động

của các enzyme (giá trị EC₅₀) có thể đánh giá được khả năng ức chế enzyme của cao tối ưu LXĐ. Giá trị EC₅₀ càng nhỏ thì chứng minh khả năng ức chế enzyme của cao chiết càng cao và ngược lại. Bên cạnh việc so sánh với tinh chất acarbose, hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của cao tối ưu LXĐ còn được so sánh với cao LXĐ (cao chiết ở điều kiện bình thường chưa được tối ưu)- Kết quả trình bày trong Bảng 3 cho thấy, khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase tăng dần theo thứ tự từ cao LXĐ < cao tối ưu LXĐ < acarbose. Cụ thể, cao tối ưu LXĐ có khả năng ức chế enzyme α -amylase (EC₅₀=156,03±0,43 µg/mL) và α -glucosidase (EC₅₀=26,33±0,76 µg/mL) mạnh hơn cao LXĐ (EC_{50, α -amylase}=455,08±4,46 µg/mL; EC_{50, α -glucosidase}=76,56±0,87 µg/mL) lần lượt là 2,92 và 2,91 lần. Tinh chất acarbose được xác định là có hoạt tính ức chế enzyme α -amylase (EC₅₀=20,02±0,55 µg/mL) và α -glucosidase (EC₅₀=4,66±0,08 µg/mL) mạnh hơn cao tối ưu LXĐ là lượt là 7,79 và 5,65 lần. Như vậy, nghiên cứu cho thấy, cao tối ưu LXĐ giàu polyphenol và flavonoid có khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase mạnh hơn cao LXĐ. Từ đó, hàm lượng polyphenol và flavonoid được chứng minh đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase. Nghiên cứu của Williams (2013) và Kang et al. (2014) cho thấy các cao chiết thực vật có hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase phụ thuộc vào hàm lượng polyphenol và flavonoid.

Bảng 3. Nồng độ ức chế 50% sự hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase

Phương pháp	Giá trị EC ₅₀ (µg/mL)		
	Cao LXĐ tối ưu	Cao LXĐ	Acarbose
Enzyme α -amylase	156,03 ^b ±0,43	455,08 ^a ±4,46	20,02 ^c ±0,55
Enzyme α -glucosidase	26,33 ^b ±0,76	76,56 ^a ±0,87	4,66 ^c ±0,08

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. Cao LXĐ là cao được ly trích bằng phương pháp ngâm trong dung môi ethanol 99,5% (v/v), nhiệt độ 30°C, thời gian ly trích 24 giờ và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/10 (w/v).

4. KẾT LUẬN

Hàm lượng polyphenol và flavonoid ly trích được từ LXĐ chịu ảnh hưởng đáng kể bởi nồng độ ethanol, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian ly trích. Nghiên cứu đã tiến hành tối ưu hóa quy trình ly trích polyphenol và flavonoid bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo mô hình Box-Behnken trong phần mềm Design Expert 11.0. Bột dược liệu LXĐ được ngâm trong ethanol 69% (v/v) với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/36 (w/v), nhiệt độ chiết xuất là 60°C trong 6 giờ thì thu được cao chiết LXĐ giàu polyphenol (120,30±1,15 mg GAE/g cao chiết)

và flavonoid (302,39±1,78 mg QE/g cao chiết). Đồng thời, nghiên cứu cũng cho thấy, cao tối ưu LXĐ giàu polyphenol và flavonoid có khả năng trung hòa tốt gốc tự do DPPH (EC₅₀=26,73±1,16 µg/mL), NO[•] (EC₅₀=55,43±0,78 µg/mL), ABTS^{•+} (EC₅₀=7,79±0,01 µg/mL), khử hiệu quả các phức chất ở phương pháp RP (EC₅₀=9,03±0,12 µg/mL) và FRAP (EC₅₀=9,20±0,30 µg/mL) và TAC (EC₅₀=59,49±2,61 µg/mL). Các enzyme α -amylase (EC₅₀=156,03±0,43 µg/mL) và α -glucosidase (EC₅₀=26,33±0,76 µg/mL) cũng bị ức chế bởi cao tối ưu LXĐ.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Tây Ninh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alisi, C. S., & Onyeze, G. O. C. (2008). Nitric oxide scavenging ability of ethyl acetate fraction of methanolic leaf extracts of *Chromolaena odorata* (Linn.). *African Journal of Biochemistry Research*, 2(7), 145-150. DOI:10.5897/AJBR.9000174.
- Anh, V. T. T., Trang, D. T. X., Kamei, K., Linh, T. C., Pham-Khanh, N. H., Tuan, N. T., & Danh, L. T. (2021). Phytochemicals, antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Milusa velutina* flowers. *Horticulturae*, 7(12), 555-567. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120555>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of stable free radicals. *Nature*, 181(4617), 1199-2000. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bộ Y Tế (2018). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.12.005>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P., & Quiles, J. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23, 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Eslami, A., Asadi, A., Meserghani, M., & Bahrami, H. (2016). Optimization of sonochemical degradation of amoxicillin by sulfate radicals in aqueous solution using response surface methodology (RSM). *Journal of Molecular Liquids*, 222, 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.07.096>
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of viscozyme L assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106: 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.041>
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988. DOI: 10.3390/i8090950.
- Hộ, P. H. (2000). *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Hu, X. Q., Han, W., Han, Z. Z., Liu, Q. X., Xu, X. K., Fu, P., & Li, H. L. (2014). A new macrocyclic lactone and a new quinoflavan from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry Letters*, 7, 169-172. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.015>
- Kaur, G., Padiya, R., Adela, R., Putcha, U. K., Reddy, G. S., Reddy, B. R., & Banerjee, S. K. (2016). Garlic and resveratrol attenuate diabetic complications, loss of β -cells, pancreatic and hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 360. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00360>
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., & Kadowaki, T. (2002). Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 55(1), 65-85. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(01\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(01)00365-5)
- Ly, T. N., Shimoyamada, M., & Yamauchi, R. (2006). Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3786-3793. <https://doi.org/10.1021/jf052743f>
- Luo, D., Xiong, S., Li, Q. G., Jiang, L., Niu, Q. W., He, L. J., Li, Y. L., Zhang, Y. B., & Wang, G. C. (2018). Terpenoids from the stems of *Celastrus hindsii* and their anti-RSV activities. *Fitoterapia*, 130, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.08.018>
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76(4), 519-525. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00305-3)
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-316. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Pham, D. C., Nguyen, H.C., Nguyen, T. L., Ho, H. L., Trinh, T. K., Riyaphan, J., & Weng, C. F.

- (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from *Celastrus hindsii* leaves using response surface methodology and evaluation of their antioxidant and antitumor activities. *BioMed Research International*, 3497107. <https://doi.org/10.1155/2020/3497107>
- Phụng, N. K. P. (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
<https://doi.org/10.1155/2020/3497107>.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269, 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Şensoy, I., Rosen, R. T., Ho, C. T., & Karwe, M. V. (2006). Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 99(2), 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.007>
- Shai, L., Magano, S., Lebelo, S., & Mogale, A. (2011). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2863-2867. <https://doi.org/10.5897/JMPR>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. M., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104, 1106-1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.019>.
- Thu Dao, T. A., Webb, H. K., & Malherbe, F. (2021). Optimisation of pectin extraction from fruit peels by response surface method: conventional versus microwave-assisted heating. *Food Hydrocolloids*, 106475. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106475>.
- Wang, L., Zhang, Y., Xu, M., Wang, Y., Cheng, S., Liebrecht, A., & Qi, X. (2013). Anti-diabetic activity of *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves' polysaccharide in STZ-induced diabetic mice. *Int. J. Biol. Macromol*, 61, 317-321. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.07.028.
- Williams, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 48-57. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200511>.
- Xiao-Ping, Y., Chun-Qing, S., Ping, Y., & Ren-Gang, M. (2010). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional Chinese medicine used for diabetes mellitus. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8, 349-352. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(10\)60041-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(10)60041-6)
- Xiao, W., Han, L., & Shi, B. (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614-618. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.025>.
- Zhenhua, Y., Wei, Z., Fajin, F., Yong, Z., & Wenyi, K., (2014). α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3, 136-174. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>.