

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine từ quả Tiêu lốt (*Piper longum* L., Piperaceae) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Phan Nguyễn Thu Xuân¹, Đỗ Ngọc Giáng My¹, Sa Li Hah², Bùi Thế Vinh^{1,*}

¹Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

²Trường Đại học Công nghệ Miền Đông

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tiêu lốt là dược liệu chứa piperine, một alkaloid đặc trưng có giá trị trong nghiên cứu và kiểm soát chất lượng dược liệu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Tối ưu hóa phương pháp và điều kiện chiết xuất piperine từ Tiêu lốt bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là quy trình chiết xuất piperine từ quả Tiêu lốt. Nghiên cứu khảo sát hai phương pháp chiết là hồi lưu và chiết xuất có hỗ trợ siêu âm để lựa chọn phương pháp phù hợp, sau đó tối ưu hóa các điều kiện chiết theo thiết kế Box-Behnken. Hàm lượng piperine trong các mẫu chiết được xác định bằng HPLC-UV trên cột C18 theo phương pháp chuẩn ngoại nhiều điểm. **Kết quả:** Chiết xuất có hỗ trợ siêu âm cho hiệu quả thu nhận piperine cao hơn chiết hồi lưu, với hàm lượng trung bình đạt 81.41 ± 8.22 mg PE/g nguyên liệu so với 70.62 ± 1.17 mg PE/g nguyên liệu. Điều kiện chiết tối ưu là tỷ lệ nguyên liệu/ethanol 1:11 (w/v), nhiệt độ 55.1°C và thời gian 8.8 phút; hàm lượng piperine dự đoán đạt 51.54 mg PE/g nguyên liệu, trong khi giá trị thực nghiệm đạt 51.86 mg PE/g nguyên liệu. **Kết luận:** Phương pháp đáp ứng bề mặt là công cụ phù hợp để lựa chọn phương pháp và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine từ Tiêu lốt.

Từ khóa: Tiêu lốt, piperine, chiết xuất có hỗ trợ siêu âm, phương pháp đáp ứng bề mặt, Box-Behnken

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu lốt (*Piper longum* L.) là dược liệu thuộc họ Hồ tiêu (Piperaceae), phân bố ở Ấn Độ, Nam Trung Quốc và nhiều nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam [1]. Trong y học cổ truyền, dược liệu này được sử dụng trong nhiều bài thuốc liên quan đến rối loạn tiêu hóa, bệnh đường hô hấp và một số chứng đau nhức. Những ứng dụng này cho thấy Tiêu lốt là nguồn nguyên liệu có giá trị, cần được nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và khả năng khai thác trong lĩnh vực dược liệu.

Trong số các hợp chất đã được ghi nhận ở Tiêu lốt, piperine là alkaloid đặc trưng và được quan tâm nhiều nhất. Hợp chất này không chỉ tạo nên vị cay đặc trưng của chi Piper mà còn được báo cáo có nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý như chống oxy hóa, chống viêm, điều hòa miễn dịch và cải thiện sinh khả dụng của một số hoạt chất khác [2, 3]. Vì vậy, piperine thường được xem là chỉ thị hóa học quan trọng trong nghiên cứu kiểm soát chất lượng và phát triển các sản phẩm

từ Tiêu lốt.

Để thu nhận piperine từ dược liệu, nhiều phương pháp chiết đã được áp dụng như chiết ngâm, chiết hồi lưu, chiết Soxhlet, chiết xuất có hỗ trợ siêu âm, chiết vi sóng hoặc chiết bằng CO₂ siêu tới hạn [4 - 6]. Mỗi phương pháp có những ưu điểm và hạn chế riêng về thời gian chiết, hiệu suất thu hồi, mức tiêu thụ dung môi và khả năng ứng dụng thực tiễn. Bên cạnh việc lựa chọn phương pháp chiết, các thông số công nghệ như tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết cũng ảnh hưởng đáng kể đến lượng piperine thu được. Do đó, phương pháp đáp ứng bề mặt đã được ứng dụng rộng rãi trong tối ưu hóa quy trình chiết các hợp chất tự nhiên vì cho phép đánh giá đồng thời ảnh hưởng độc lập và tương tác của nhiều yếu tố với số lượng thí nghiệm hợp lý [7, 8].

Tại Việt Nam, việc xác định hàm lượng piperine trong hạt tiêu đã được chuẩn hóa bằng cả phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và phương pháp đo quang phổ thông qua TCVN

Tác giả liên hệ: Bùi Thế Vinh

Email: vinhbt@hiu.vn

9684:2013 và TCVN 9683:2013 [9, 10]. Bên cạnh đó, một nghiên cứu trong nước trên hồ tiêu ở tỉnh Kon Tum cũng cho thấy hàm lượng piperine biến thiên đáng kể giữa các mẫu nguyên liệu, qua đó nhấn mạnh ý nghĩa của việc lựa chọn điều kiện phân tích và xử lý mẫu phù hợp [11]. Tuy nhiên, các dữ liệu trong nước hiện chủ yếu tập trung trên hồ tiêu (*Piper nigrum*), trong khi dữ liệu dành riêng cho Tiêu lốt (*Piper longum*) còn hạn chế, đặc biệt ở khía cạnh tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine phù hợp với điều kiện nguyên liệu và thực nghiệm trong nước. Từ đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn phương pháp chiết thích hợp và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine từ Tiêu lốt bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Hàm lượng piperine trong các mẫu chiết được xác định bằng HPLC-UV.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là quy trình chiết piperine từ quả Tiêu lốt (*Piper longum* L.). Mẫu dược liệu được thu hái tại xã Tân Thạnh Tây, huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh vào tháng 5 năm 2025 và được định danh tên khoa học bởi cử nhân Cao Ngọc Giang của Phòng Tài nguyên Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh.

Sau khi thu hái, mẫu được làm sạch, loại bỏ tạp chất cơ học, sấy khô và nghiền thành được nghiền nhỏ bằng máy xay dược liệu và rây qua rây số 500 theo Phụ lục 3.5 Dược điển Việt Nam V để thu bột dược liệu có kích thước tiểu phân tương đối đồng nhất. Bột dược liệu được bảo quản trong bao bì kín, nơi khô ráo, tránh ánh sáng cho đến khi phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, chất chuẩn và thiết bị

Chất chuẩn piperine (CAS: 94-62-2, độ tinh khiết 98.0%, Adamas-beta, Trung Quốc), methanol đạt cấp HPLC grade (Merck, Đức), ethanol 96% và nước cất 2 lần điều chế tại phòng thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu.

Hệ thống phân tích gồm máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-2030, cột Shim-pack GIST C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm), máy quang phổ UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Nhật), cân phân tích Shimadzu UniBloc (Nhật Bản), bể siêu âm Elmasonic S 180 H (Elma, Đức), bộ chiết hồi lưu và các dụng cụ thủy tinh thông thường.

2.2.2. Xác định hàm lượng piperine trong các mẫu chiết bằng HPLC-UV

Hàm lượng piperine trong các mẫu chiết được xác định bằng HPLC-UV. Trong nghiên cứu này, HPLC-UV được sử dụng như công cụ phân tích để theo dõi hàm lượng piperine phục vụ khảo sát phương pháp chiết và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất. Việc xác định piperine bằng sắc ký pha đảo trên *Piper longum* đã được ghi nhận trong các công bố gần đây [12].

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 20.0 mg piperine chuẩn, hòa tan và định mức đến 20 mL bằng methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 μg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng bằng methanol để thu dãy dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 4, 8, 10, 20 và 30 μg/mL. Trước khi phân tích, các dung dịch được lọc qua màng lọc 0.45 μm.

Chuẩn bị dung dịch thử: Sau khi chiết bằng các phương pháp khảo sát, dịch chiết được lọc và cô thu hồi dung môi để thu cao chiết. Cân chính xác 50.0 mg cao chiết vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 70 mL methanol, lắc hoặc siêu âm đến khi tan hoàn toàn, sau đó bổ sung methanol đến vạch. Dung dịch được lọc qua màng lọc 0.45 μm. Hút chính xác 1.0 mL dung dịch lọc vào bình định mức 25 mL, thêm methanol đến vạch, lắc đều và dùng để phân tích HPLC.

Điều kiện sắc ký: Piperine được xác định bằng hệ thống HPLC sử dụng cột C18 (4.6 × 250 mm; 5 μm), đầu dò UV ở bước sóng 343 nm. Pha động gồm methanol và nước theo tỷ lệ 77:23 (v/v), tốc độ dòng 1.0 mL/phút và thể tích tiêm mẫu 10 μL. Hàm lượng piperine trong mẫu được tính bằng phương pháp chuẩn ngoại nhiều điểm. Điều kiện sắc ký được lựa chọn trên cơ sở tham khảo các công bố gần đây về phân tích piperine trong *Piper longum* [12].

2.2.3. Khảo sát lựa chọn phương pháp chiết

Phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm: Mỗi thí nghiệm sử dụng 20 g bột dược liệu, chiết với 180 mL ethanol 96%, tương ứng với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:9 (w/v). Quá trình chiết được thực hiện bằng siêu âm trong 10 phút ở 70°C và lặp lại 3 lần. Sau khi chiết, dịch chiết được gộp, lọc qua giấy lọc, cô thu hồi dung môi để thu cao chiết, rồi tiến hành định lượng piperine bằng HPLC. Mỗi điều kiện được thực hiện trên 3 mẫu lặp lại.

Phương pháp chiết hồi lưu: Chiết hồi lưu được tiến hành với 20 g bột dược liệu và 180 mL

ethanol 96%, tương ứng với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:9 (w/v). Quá trình chiết được thực hiện ở 70°C trong tổng thời gian 2 giờ, chia thành 3 lần chiết, mỗi lần 40 phút. Sau chiết, dịch chiết được gộp, lọc, cô đuổi dung môi để thu cao chiết và định lượng piperine bằng HPLC. Mỗi điều kiện được thực hiện trên 3 mẫu lặp lại.

Hiệu quả của hai phương pháp được đánh giá dựa trên hàm lượng piperine thu được trong cao chiết. Phương pháp cho hàm lượng piperine cao hơn được lựa chọn cho bước tối ưu hóa tiếp theo.

2.2.4. Tối ưu hóa quy trình chiết bằng thiết kế Box-Behnken

Sau khi lựa chọn được phương pháp chiết thích hợp, nghiên cứu sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt theo thiết kế Box-Behnken để tối ưu hóa các điều kiện chiết piperine [7, 8]. Phần mềm Design Expert 13 được sử dụng để xây dựng mô hình thực nghiệm, xử lý số liệu và xác định điều kiện tối ưu.

Ba biến độc lập được lựa chọn trong mô hình gồm: A: Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol; B: Nhiệt

độ chiết; C: Thời gian chiết có hỗ trợ siêu âm.

Mỗi biến được khảo sát ở ba mức: Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol: 1:6, 1:9 và 1:12 (w/v); nhiệt độ chiết: 50°C, 60°C và 70°C; thời gian chiết: 5, 10 và 15 phút.

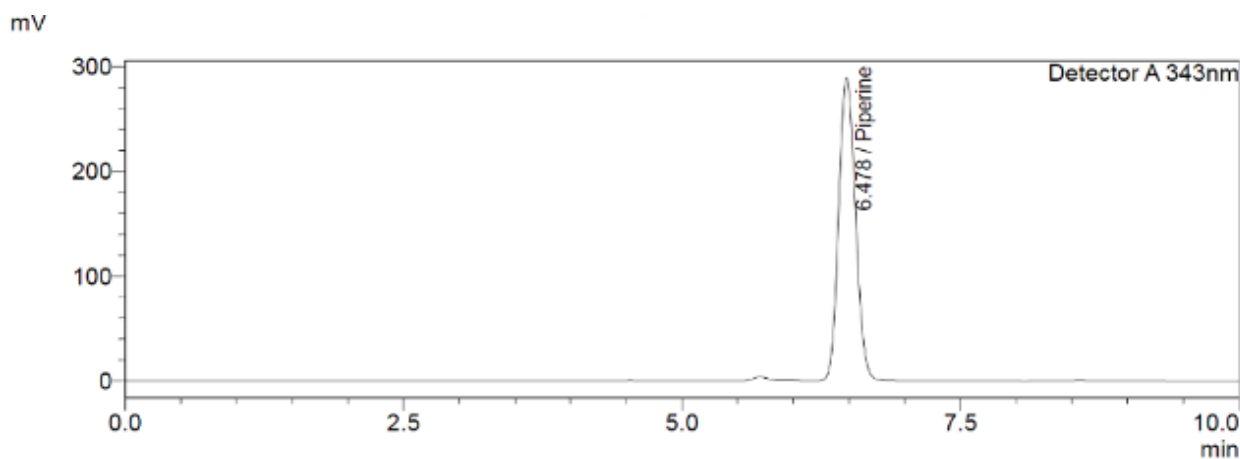
Biến phụ thuộc của mô hình là hàm lượng piperine thu được, xác định bằng HPLC. Từ kết quả thực nghiệm, phần mềm xây dựng phương trình hồi quy bậc hai, đánh giá ý nghĩa thống kê của mô hình bằng phân tích phương sai (ANOVA), đồng thời xác định ảnh hưởng riêng lẻ và ảnh hưởng tương tác giữa các yếu tố khảo sát. Điều kiện tối ưu dự đoán từ mô hình được kiểm chứng lại bằng thí nghiệm kiểm chứng.

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại và kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình kèm độ lệch chuẩn. Đối với mô hình tối ưu hóa, mức độ phù hợp của mô hình được đánh giá thông qua các thông số thống kê như hệ số xác định (R^2), Adjusted R^2 , Predicted R^2 , hệ số biến thiên (CV%) và kiểm định ANOVA. Mô hình được xem là có ý nghĩa khi giá trị $p < 0.05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

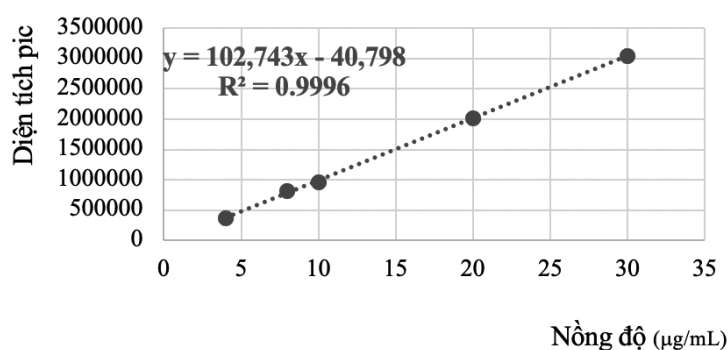
3.1. Xây dựng đường chuẩn định lượng piperine bằng HPLC



Hình 1. Sắc ký đồ chuẩn piperine 30 µg/mL

Bảng 1. Tương quan giữa nồng độ dung dịch chuẩn và diện tích pic piperine

STT	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic
1	4	366,079
2	8	812,524
3	10	955,178
4	20	2,018,601
5	30	3,041,139



Hình 2. Đường chuẩn piperine

Dung dịch chuẩn piperine được khảo sát trong khoảng nồng độ 4 - 30 µg/mL. Kết quả tương quan giữa nồng độ dung dịch chuẩn và diện tích pic được trình bày ở Bảng 1 và Hình 2. Từ số liệu thực nghiệm, phương trình hồi quy tuyến tính được xác lập là $y = 102743x - 40798$, với $R^2 = 0.9996$. Đường chuẩn này được sử dụng để xác định hàm lượng

piperine trong các mẫu chiết của nghiên cứu.

3.2. Khảo sát lựa chọn phương pháp chiết xuất

Hiệu quả chiết xuất piperine giữa phương pháp chiết xuất bằng ethanol có hỗ trợ siêu âm và phương pháp chiết hồi lưu được khảo sát trong cùng điều kiện sử dụng ethanol 96%. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát phương pháp chiết xuất piperine từ Tiêu lốt (n = 3)

Phương pháp chiết	Lần	Diện tích pic piperine	Nồng độ quy đổi từ đường chuẩn (µg/mL)	Hàm lượng piperine thu được (mg PE/g nguyên liệu)	Hàm lượng trung bình (mg PE/g nguyên liệu)	RSD (%)
Chiết xuất có hỗ trợ siêu âm	1	569,430	5.94	79.19	81.41 ± 2.22	2.73
	2	586,537	6.11	81.41		
	3	603,644	6.27	83.63		
Chiết hồi lưu	1	507,847	5.34	71.2	70.62 ± 1.17	1.66
	2	509,224	5.35	71.38		
	3	492,986	5.2	69.27		

Hiệu quả chiết xuất piperine giữa hai phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm và chiết hồi lưu được khảo sát trong cùng điều kiện sử dụng ethanol 96%. Kết quả ở Bảng 2 và Hình 3 cho thấy phương pháp chiết xuất bằng ethanol có hỗ trợ siêu âm cho hàm lượng piperine trung bình cao hơn phương pháp chiết hồi lưu. Cụ thể, phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm đạt 81.41 ± 2.22 mg PE/g nguyên liệu, trong khi chiết hồi lưu đạt 70.62 ± 1.17 mg PE/g nguyên liệu. Từ kết quả này, phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm

ISSN: 2615 - 9686

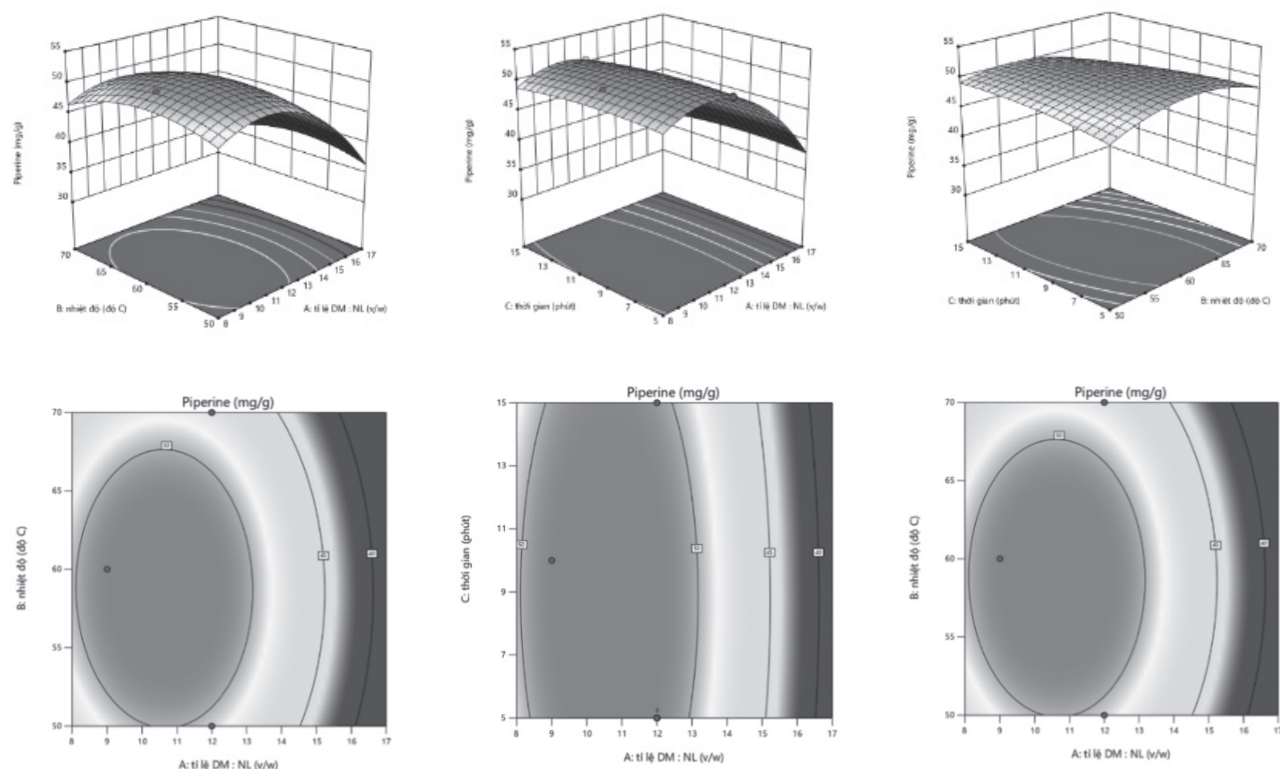
được lựa chọn để tối ưu hóa quy trình chiết xuất piperine từ Tiêu lốt.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, thiết kế Box-Behnken

Sau khi lựa chọn được phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm, nghiên cứu tiếp tục tối ưu hóa ba yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất, gồm tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol (A), nhiệt độ chiết (B) và thời gian chiết có hỗ trợ siêu âm (C). Kết quả thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm theo mô hình thiết kế Box-Behnken

Nghiệm thức	Tỷ lệ nguyên liệu/ethanol (w/v)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Hàm lượng piperine thực nghiệm (mg PE/g nguyên liệu)
1	1:06	50	10	43.46 ± 0.09
2	1:12	50	10	49.34 ± 0.34
3	1:06	70	10	41.60 ± 1.37
4	1:12	70	10	47.16 ± 0.91
5	1:06	60	5	44.42 ± 0.63
6	1:06	60	15	42.80 ± 1.05
7	1:12	60	15	50.43 ± 0.09
8	1:09	50	5	46.55 ± 0.05
9	1:09	70	5	48.50 ± 0.49
10	1:09	50	15	49.48 ± 0.07
11	1:09	70	15	46.41 ± 0.29
12	1:09	60	10	51.23 ± 0.32
13	1:12	60	5	51.49 ± 0.38
14	1:09	60	10	51.29 ± 0.43
15	1:09	60	10	51.35 ± 0.28
16	1:09	60	10	51.24 ± 0.10
17	1:09	60	10	51.28 ± 0.98



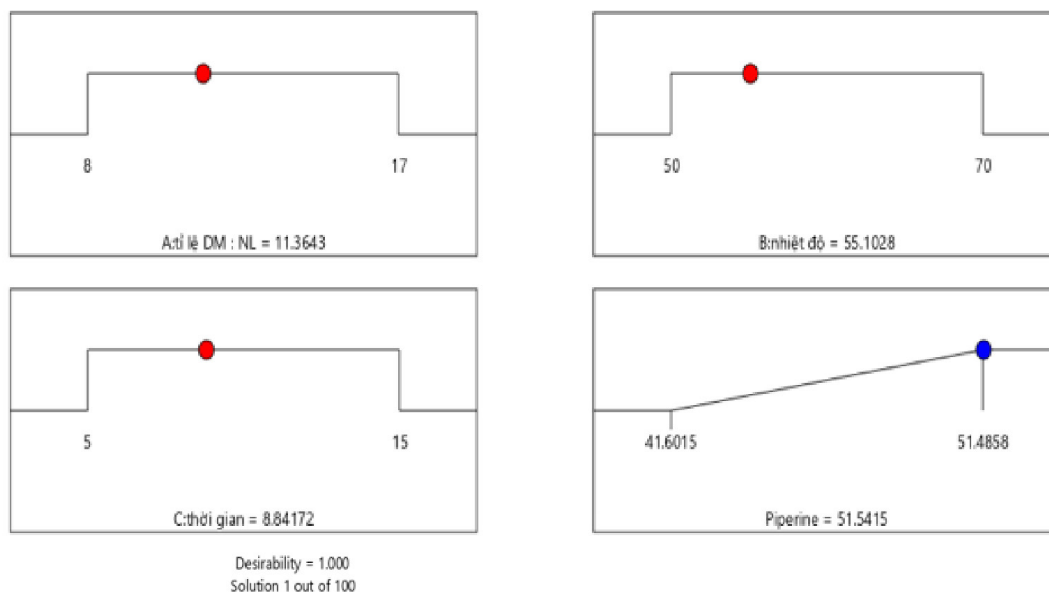
Hình 4. Mặt đáp ứng hàm lượng piperine (A) theo nhiệt độ và tỉ lệ nguyên liệu/dung môi; (B) theo thời gian và tỉ lệ nguyên liệu / dung môi; (C) theo thời gian và nhiệt độ

Hàm lượng piperine thu được dao động từ 41.60 ± 1.37 đến 51.49 ± 0.38 mg PE/g nguyên liệu. Trong số các nghiệm thức đã thực hiện, nghiệm thức 13 cho giá trị cao nhất, tương ứng với điều kiện tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol 1:12 (w/v), nhiệt độ 60°C và thời gian chiết có hỗ trợ siêu âm 5 phút. Kết quả này cho thấy hàm lượng piperine chịu ảnh hưởng đồng thời của cả ba yếu tố khảo sát. Các bề mặt đáp ứng tương ứng được thể hiện

ở Hình 4.

Từ dữ liệu thực nghiệm, phương trình hồi quy bậc hai dự đoán hàm lượng piperine được xác lập như sau: $Y = 50.97 - 5.70A - 0.7354B - 0.3345C - 0.1189AB - 0.0312AC - 1.25BC - 6.90A^2 - 2.78B^2 - 0.7194C^2$

Trong đó, Y là hàm lượng piperine dự đoán; A là tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol; B là nhiệt độ chiết; và C là thời gian chiết có hỗ trợ siêu âm.



Hình 5. Biểu đồ tối ưu hóa điều kiện chiết piperine theo mô hình Box-Behnken

3.4. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy

Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích ANOVA của mô hình Box-Behnken

Nguồn biến thiên	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value
Model	178.13	9	19.79	31.85	< 0.0001
A - Tỷ lệ NL/Ethanol	6.20	1	6.20	9.98	0.0160
B - Nhiệt độ	1.16	1	1.16	1.87	0.2137
C - Thời gian	0.3837	1	0.3837	0.6176	0.4577
AB	0.0251	1	0.0251	0.0405	0.8463
AC	0.0023	1	0.0023	0.0037	0.9532
BC	6.28	1	6.28	10.11	0.0155
A ²	22.26	1	22.26	35.83	0.0006
B ²	18.29	1	18.29	29.44	0.0010
C ²	1.23	1	1.23	1.97	0.2028
Residual	4.35	7	0.6213		
Lack of Fit	4.31	3	1.44	153.97	0.0001
Pure Error	0.0373	4	0.0093		
Cor Total	182.48	16			

Kết quả phân tích ANOVA của mô hình được trình bày ở Bảng 4. Mô hình hồi quy có ý nghĩa thống kê cao với $p < 0.0001$. Trong các yếu tố khảo sát, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol (A) có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến hàm lượng piperine với $p = 0.0160$. Tương tác giữa nhiệt độ và thời gian chiết (BC) cũng có ý nghĩa thống kê với $p = 0.0155$. Ngoài ra, các thành phần bậc hai A2 và B2 đều có ý nghĩa thống kê, cho thấy mối quan hệ giữa các yếu tố này với hàm lượng piperine có tính phi tuyến. Ngược

lại, các yếu tố B, C, AB, AC và C2 chưa cho thấy ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê trong phạm vi khảo sát.

Mặc dù mô hình hồi quy có ý nghĩa thống kê và cho thấy khả năng hỗ trợ tối ưu hóa trong phạm vi khảo sát, giá trị Lack of Fit có ý nghĩa thống kê ($p = 0.0001$) cho thấy mô hình chưa mô tả hoàn toàn dữ liệu thực nghiệm. Do đó, mô hình nên được sử dụng như một công cụ định hướng tối ưu hóa và cần được diễn giải một cách thận trọng.

3.5. Đánh giá độ phù hợp của mô hình tối ưu hóa

Các chỉ số đánh giá độ phù hợp của mô hình được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Các chỉ số đánh giá độ phù hợp của mô hình

Thông số	Giá trị
Std. Dev.	0.7883
Mean	48.12
C.V. %	1.64
R^2	0.9762
Adjusted R^2	0.9455
Predicted R^2	0.8218
Adeq Precision	16.1341

Các chỉ số đánh giá độ phù hợp của mô hình được trình bày ở Bảng 5. Mô hình có $R^2 = 0.9762$, Adjusted $R^2 = 0.9455$ và Predicted $R^2 = 0.8218$, cho thấy phần lớn biến thiên của hàm lượng piperine được giải thích bởi mô hình hồi quy trong phạm vi khảo sát. Giá trị C.V. = 1.64% thấp, phản ánh độ lặp lại tương đối tốt của thí nghiệm. Bên cạnh đó, chỉ số Adeq Precision lớn hơn 4 cho thấy tín hiệu của mô hình vẫn đủ để sử dụng cho mục đích tối ưu hóa.

3.6. Điều kiện chiết xuất tối ưu

Từ kết quả xử lý bằng phần mềm Design Expert, điều kiện tối ưu nhằm thu được hàm lượng piperine cao nhất được xác định là: Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol 1:11 (w/v); Nhiệt độ chiết 55.1°C; Thời gian chiết có hỗ trợ siêu âm 8.8 phút.

Ở điều kiện này, hàm lượng piperine dự đoán đạt 51.54 mg PE/g nguyên liệu. Điều kiện tối ưu này nằm trong vùng trung gian của miền khảo sát, cho thấy hiệu quả chiết xuất piperine phụ thuộc vào sự phối hợp hợp lý giữa tỷ lệ dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết, thay vì chỉ tăng cực đại một yếu tố đơn lẻ.

Mặc dù nghiệm thức 13 trong Bảng 3 cho giá trị cao nhất trong số các thí nghiệm đã thực hiện (51.49 ± 0.38 mg PE/g nguyên liệu), mô hình hồi quy vẫn dự đoán được một vùng điều kiện tối ưu lân cận với giá trị dự đoán cao hơn. Kết quả kiểm chứng thực nghiệm tại điều kiện tối ưu cho thấy hàm lượng piperine thu được là 51.86 mg PE/g nguyên liệu, cao hơn giá trị lớn nhất trong ma trận thực nghiệm ban đầu, cho thấy việc sử dụng mô hình Box-Behnken có ý nghĩa trong việc xác định vùng điều kiện thích hợp hơn so với chỉ lựa chọn nghiệm thức có giá trị cao nhất trong thiết kế ban đầu.

3.7. Kết quả kiểm chứng thực nghiệm tại điều kiện tối ưu

Để đánh giá khả năng dự đoán của mô hình, thí nghiệm kiểm chứng được thực hiện tại điều kiện tối ưu do phần mềm đề xuất. Trong thực tế, các thông số 55.1°C và 8.8 phút được làm tròn về 55°C và 8 phút để thuận tiện cho thao tác thực nghiệm. Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. So sánh giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm tại điều kiện tối ưu

Điều kiện	Tỷ lệ nguyên liệu/ ethanol (w/v)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Hàm lượng piperine (mg PE/g nguyên liệu)
Dự đoán	1:11	55.1	8.8	51.54
Thực nghiệm	1:11	55	8	51.86

Giá trị piperine thực nghiệm thu được là 51.86 mg PE/g nguyên liệu, trong khi giá trị dự đoán của mô hình là 51.54 mg PE/g nguyên liệu [11]. Độ chênh lệch giữa hai giá trị là 0.32 mg PE/g nguyên liệu, cho thấy mô hình có khả năng hỗ trợ dự đoán xu hướng tối ưu hóa tương đối phù hợp trong phạm vi khảo sát của nghiên cứu.

4. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm cho hàm lượng piperine cao hơn chiết hồi lưu trong cùng điều kiện sử dụng ethanol 96%. Xu hướng này phù hợp với cơ chế của chiết có hỗ trợ siêu âm, trong đó hiện tượng cavitation góp phần phá vỡ cấu trúc mô thực vật, làm tăng khả năng chuyển khối của hoạt chất từ nguyên liệu vào dung môi [4, 6]. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Rathod và Rathod, trong đó chiết xuất có hỗ trợ siêu âm cho hiệu quả thu nhận piperine tốt hơn so với một số phương pháp chiết truyền thống [6].

Kết quả tối ưu hóa theo thiết kế Box-Behnken cho thấy tỷ lệ nguyên liệu/dung môi ethanol là yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng piperine, đồng thời tương tác giữa nhiệt độ và thời gian chiết cũng có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy hiệu quả chiết không phụ thuộc riêng lẻ vào từng thông số mà chịu ảnh hưởng đồng thời của khả năng hòa tan piperine trong hệ dung môi và quá trình truyền khối trong điều kiện siêu âm [7, 8]. Khi tăng lượng dung môi từ mức 1:6 lên vùng 1:9 - 1:12, hàm lượng piperine có xu hướng tăng, cho thấy việc gia tăng thể tích dung môi đã hỗ trợ quá trình hòa tan hoạt chất [4, 6]. Tuy nhiên, nhiệt độ và thời gian không làm tăng hiệu suất theo xu hướng tuyến tính, mà hình thành một vùng điều kiện tối ưu trong phạm vi khảo sát [7, 8].

Trong số các nghiệm thức đã thực hiện, điều kiện 1:12 (w/v), 60°C và 5 phút cho hàm lượng

piperine cao nhất là 51.49 ± 0.38 mg PE/g nguyên liệu. Tuy nhiên, khi xử lý toàn bộ dữ liệu bằng mô hình hồi quy bậc hai, phần mềm dự đoán vùng điều kiện tối ưu là 1:11 (w/v), 55.1°C và 8.8 phút, với hàm lượng piperine dự đoán 51.54 mg PE/g nguyên liệu; kết quả kiểm chứng thực nghiệm đạt 51.86 mg PE/g nguyên liệu. Điều này cho thấy mô hình Box-Behnken có giá trị trong việc định hướng lựa chọn vùng điều kiện chiết phù hợp hơn so với chỉ dựa vào nghiệm thức có giá trị cao nhất trong ma trận ban đầu [7, 8]. Tuy nhiên, do chỉ số Lack of Fit có ý nghĩa thống kê, mô hình này nên được xem là công cụ hỗ trợ tối ưu hóa trong phạm vi khảo sát, thay vì mô tả hoàn toàn dữ liệu thực nghiệm.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã lựa chọn được phương pháp chiết thích hợp và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine từ Tiêu lốt bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Kết quả khảo sát cho thấy chiết xuất bằng ethanol có hỗ trợ siêu âm cho hiệu quả thu nhận piperine cao hơn chiết hồi lưu, với hàm lượng trung bình đạt 81.41 ± 2.22 mg PE/g nguyên liệu so với 70.62 ± 1.17 mg PE/g nguyên liệu. Điều kiện chiết tối ưu được xác định là tỷ lệ nguyên liệu/ethanol 1:11 (w/v), nhiệt độ 55.1°C và thời gian 8.8 phút. Ở điều kiện này, hàm lượng piperine dự đoán đạt 51.54 mg PE/g nguyên liệu, trong khi giá trị kiểm chứng thực nghiệm đạt 51.86 mg PE/g nguyên liệu. Kết quả cho thấy phương pháp đáp ứng bề mặt là công cụ phù hợp để lựa chọn phương pháp và tối ưu hóa điều kiện chiết xuất piperine từ Tiêu lốt.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC19.66.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. H. Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2. TP. Hồ Chí Minh: NXB Trẻ, tr. 956-958, 2003.
- [2] R. Zou, Y. Zhou, Y. Lu, Y. Zhao, N. Zhang, J. Liu, Y. Zhang, and Y. Fu, "Preparation, pungency and bioactivity transduction of piperine from black pepper (*Piper nigrum* L.): A comprehensive review", *Food Chemistry*, vol. 456, art. 139980, 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2024.139980.
- [3] A. K. Tripathi, A. K. Ray, and S. K. Mishra, "Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials", *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 11, no. 1, art. 16, 2022, doi: 10.1186/s43088-022-00196-1.
- [4] A. Tiwari, K. R. Mahadik, and S. Y. Gabhe, "Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties", *Medicine in Drug Discovery*, vol. 7, art. 100027, 2020, doi: 10.1016/j.medidd.2020.100027.
- [5] R. Subramanian, P. Subbramaniyan, J. N. Ameen, and V. Raj, "Double bypasses Soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*", *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 9, pp. S537-S540, 2016.
- [6] S. S. Rathod and V. K. Rathod, "Extraction of piperine from *Piper longum* using ultrasound", *Industrial Crops and Products*, vol. 58, pp. 259-264, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.03.040.
- [7] D. Baş and İ. H. Boyacı, "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology", *Journal of Food Engineering*, vol. 78, no. 3, pp. 836-845, 2007, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- [8] M. Sarfarazi, S. M. Jafari, and G. Rajabzadeh, "Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology", *Food Analytical Methods*, vol. 8, pp. 2273-2285, 2015, doi: 10.1007/s12161-014-9995-3.
- [9] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9684:2013 (ISO 11027:1993), *Hạt tiêu và nhựa dầu hạt tiêu - Xác định hàm lượng piperine - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*. Hà Nội, 2013.
- [10] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9683:2013 (ISO 5564:1982), *Hạt tiêu đen và hạt tiêu trắng nguyên hạt hoặc dạng bột - Xác định hàm lượng piperine - Phương pháp đo quang phổ*. Hà Nội, 2013.

Optimization of piperine extraction from *Piper longum* L. fruits using response surface methodology

Phan Nguyen Thu Xuan, Do Ngoc Giang My, Sa Li Hah, Bui The Vinh

ABSTRACT

Background: Long pepper contains piperine, a characteristic alkaloid of interest in research and quality control of medicinal materials. **Objective:** To optimize the extraction method and extraction conditions of piperine from long pepper using response surface methodology. **Materials and methods:** The study focused on the extraction process of piperine from *Piper longum* fruits. Reflux extraction and ultrasound-assisted extraction were compared to select a suitable method, followed by optimization of extraction conditions using a Box-Behnken design. Piperine content in the extracts was determined by HPLC-UV on a C18 column using an external standard calibration approach. **Results:** Ultrasound-assisted extraction yielded a higher piperine content than reflux extraction, with an average of 81.41 ± 8.22 mg PE/g compared to 70.62 ± 1.17 mg PE/g. The optimal extraction conditions were a material-to-ethanol ratio of 1:11 (w/v), an extraction temperature of 55.1 °C, and an extraction time of 8.8 min; the predicted piperine content was 51.54 mg PE/g raw material, while

the experimental value was 51.86 mg PE/g raw material. Conclusions: Ultrasound-assisted extraction is a suitable method for extraction of piperine from Long Pepper fruits.

Keywords: *Piper longum L., piperine, ultrasound-assisted extraction, response surface methodology, Box-Behnken*

Received: 26/3/2026

Revised: 15/5/2026

Accepted for publication: 17/6/2026