VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences

Journal homepage: https://js.vnu.edu.vn/MPS

Original Article

Optimization of Verbascoside Extraction from *Jasminum subtriplinerve* Blume Collected in Quang Tri Province Using Response Surface Methodology

Tran Van On, Hoang Quynh Hoa, Nguyen Thị Ngoc Lan, Do Hieu Loan, Nguyen Minh Quy, Pham Thi Linh Giang*

Hanoi University of Pharmacy, 13 - 15 Le Thanh Tong, Hanoi, Vietnam.

Received 6h May 2026
Revised 24th October 2026; Accepted 26th October 2026

Abstract: This study optimized the ultrasound-assisted extraction of verbascoside from *Jasminum subtriplinerve* Blume using an ethanol–water solvent system. Verbascoside content under various conditions was determined by HPTLC- Scanning. Key variables and their ranges were initially screened using the one-factor-at-a-time approach and subsequently optimized via response surface methodology with a Box–Behnken design. Ethanol concentration (10–40%), extraction temperature (50–80°C), and extraction time (15–45 min) were selected as independent variables, while verbascoside yield and total extract yield were responses. Under the optimal conditions (33% ethanol, 76°C, 43 min), the verbascoside yield reached 60.12% and total extract yield was 24.46%, with RSD values of 1.77% and 1.49%, respectively. This result provides a scientific basis for the production of a highly concentrated extract of verbascoside from the medicinal plant, opening up applications in medicine and pharmaceuticals.

Keywords: Verbascoside, Optimization, *Jasminum subtriplinerve.*

* Corresponding author.
E-mail address: giangptl@hup.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5004

Tối ưu hóa quá trình chiết xuất verbascoside từ cây Chè vằng (*Jasminum subtriplinerve* Blume) thu tại tỉnh Quảng Trị bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Trần Văn Ơn, Hoàng Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Đỗ Hiếu Loan, Nguyễn Minh Quý, Phạm Thị Linh Giang*

Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Cửa Nam, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 6 tháng 5 năm 2026
Chỉnh sửa ngày 24 tháng 10 năm 2026; Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 10 năm 2026

Tóm tắt: Nghiên cứu đã tiến hành tối ưu hóa quá trình chiết xuất verbascoside từ dược liệu Chè vằng (*Jasminum subtriplinerve* Blume) thu hái ở Quảng Trị bằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm sử dụng hệ dung môi ethanol-nước. Hàm lượng verbascoside ở các điều kiện chiết xuất khác nhau được xác định bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao kết hợp quét phổ (HPTLC-Scanning). Các biến số chính và khoảng biến được sàng lọc bằng phương pháp thay đổi một yếu tố (OFAT), sau đó được tối ưu hóa thông qua phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken. Nồng độ ethanol (10–40%), nhiệt độ chiết xuất (50–80°C) và thời gian chiết xuất (15–45 phút) được chọn làm các biến số độc lập, trong khi hiệu suất chiết verbascoside và hiệu suất chiết cao là các biến số phụ thuộc. Tại điều kiện chiết xuất tối ưu (nồng độ ethanol 33%, nhiệt độ 76°C, thời gian 43 phút), hiệu suất chiết verbascoside là 60,12% và hiệu suất chiết cao là 24,46%, với giá trị RSD lần lượt là: 1,77% và 1,49%. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học cho việc sản xuất cao giàu hoạt chất verbascoside từ dược liệu Chè vằng, mở ra ứng dụng trong sử dụng và dược phẩm.

Từ khóa: Verbascoside, Tối ưu hóa, Chè vằng.

1. Mở đầu

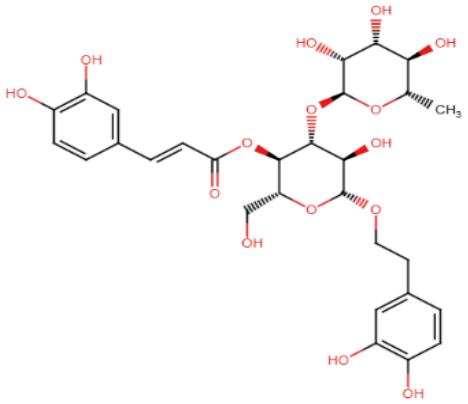
Chè vằng (*Jasminum subtriplinerve* Blume) được sử dụng trong y học dân gian với các công dụng chính như tăng tiết mật, kháng khuẩn, kháng viêm, dùng cho phụ nữ sau sinh bị nhiễm trùng, ngoài ra còn được dùng chữa phong thấp, đau nhức xương khớp và các bệnh viêm ngoài da [1]. Ở nước ta, Chè vằng được trồng nhiều ở Thanh Hóa, Nghệ An và phổ biến nhất là ở Quảng Trị. Hiện nay, Chè vằng đang được người dân ở các địa phương canh tác, lấy nguyên liệu để sản xuất một số sản phẩm đơn giản như dược liệu đóng gói, trà túi lọc và cao đặc, góp phần cải thiện thu nhập, mang lại giá trị kinh tế cho địa phương.

Bào chế cao bán thành phẩm giàu hoạt chất đóng vai trò then chốt trong việc kiểm soát chất lượng các chế phẩm từ thảo dược. Trong các hoạt chất của dược liệu Chè vằng, verbascoside là một phenylethanoid glycosid có hàm lượng cao với nhiều hoạt tính sinh học đã được chứng minh như: tác dụng chống oxy hóa [2, 3], tác dụng kháng viêm [4, 5] và tác dụng ức chế tế bào ung thư [6]. Hoạt chất này tương đối phân cực, có khả năng hòa tan tốt trong các dung môi phân cực như nước và ethanol, khó tan trong dung môi không phân cực như ether và chloroform [7].

* Tác giả liên hệ.
Địa chỉ email: giangptl@hup.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.5004

Căn cứ vào hoạt tính sinh học quan trọng và tính chất lý hóa của verbascoside, việc nghiên cứu lựa chọn được điều kiện chiết xuất cao giàu verbascoside từ dược liệu Chè vằng có ý nghĩa thiết thực trong sản xuất và ứng dụng. So với các phương pháp chiết xuất truyền thống, chiết xuất có hỗ trợ siêu âm giúp rút ngắn được thời gian chiết xuất, dễ ổn định các thông số quá trình và phù hợp cho các nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất quy mô phòng thí nghiệm. Mô hình toán học được xây dựng bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) đang được sử dụng phổ biến để xác định giá trị tối ưu của các thông số ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất chiết như nồng độ dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết xuất. Mô hình này dự đoán được sự ảnh hưởng của các yếu tố chiết xuất (biến độc lập) đến hiệu suất chiết xuất (biến phụ thuộc) từ đó dự đoán được điều kiện chiết xuất tối ưu với tối thiểu số thí nghiệm cần tiến hành. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tối ưu hóa quy trình chiết xuất verbascoside từ dược liệu Chè vằng bằng phương pháp chiết có hỗ trợ siêu âm, sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt trên mô hình Box-Behnken. Kết quả của nghiên cứu sẽ cung cấp các cơ sở khoa học ban đầu làm căn cứ để tiếp tục hoàn thiện và chuẩn hóa quy trình bào chế cao giàu hoạt chất từ dược liệu Chè vằng, mở ra ứng dụng trong sử dụng và dược phẩm đặc biệt là phát triển kinh tế cho địa phương.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của hợp chất Verbascoside.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu: bộ phận trên mặt đất của cây Chè vằng được thu hái ở xã Cam Nghĩa, huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị vào tháng 8/2023. Mẫu nghiên cứu đã được giám định tên khoa học là *Jasminum subtriplinerve* Blume bởi Thạc sĩ Nghiêm Đức Trọng, Khoa Dược liệu, Dược học cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội. Mẫu tiêu bản được lưu tại phòng tiêu bản, khoa Dược liệu – Dược học cổ truyền – Trường Đại học Dược Hà Nội với mã số tiêu bản là HNIP/18811/24.

Xử lý sau khi thu hái: Phần trên mặt đất của cây Chè vằng được làm sạch tạp chất, cắt nhỏ rồi sấy khô ở nhiệt độ 50 – 60°C trong 10 giờ đến $RH_{dl} \leq 11\%$. Xay dược liệu đã sơ chế thành bột thô (bột dưới rây 1400 nm và trên rây 750 nm). Bảo quản bột trong túi PE và hộp nhựa, trong điều kiện phòng, tránh ánh sáng trực tiếp.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Chuẩn verbascoside độ tinh khiết 98% lô số CFS202401 cung cấp bởi Chemfaces, methanol (Việt Nam), ethanol 96% (Việt Nam), acid formic (Trung Quốc), ethyl acetat (Trung Quốc).

Hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao kết hợp quét phổ HPTLC-Scanning từ CAMMAG tại Khoa Hóa phân tích – Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội. Bản mỏng sắc ký lớp mỏng pha thường (TLC-Silica gel 60 F254, Merck), tủ sấy Memmert (Đức), cân kỹ thuật Sartorius, cân phân tích AND GR200 (A&D, Nhật Bản) độ chính xác 0,1 mg, bể siêu âm WUC-D22H (Daihan Scientific, Hàn Quốc), máy cất quay Buchi, máy đo hàm ẩm A&D – MF50, dụng cụ thí nghiệm thường quy có tính chính xác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp định lượng verbascoside trong dược liệu và cao chiết Chè vằng

Phương pháp định lượng được xây dựng dựa trên phương pháp được mô tả trong tài liệu [8],

đồng thời có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện và thiết bị tại phòng nghiên cứu. Cụ thể, khoảng 0,1 g mẫu thử được cân chính xác, cho vào bình định mức 20 mL, thêm methanol (MeOH) và tiến hành siêu âm trong 10 phút. Sau đó, bổ sung MeOH đến vạch, lắc đều và lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 µm trước khi tiến hành phân tích. Quá trình sắc ký được thực hiện trên bản mỏng TLC-Silica gel 60 F254, kích thước 20 × 10 cm. Hệ dung môi pha động gồm ethyl acetat : acid formic : methanol : nước với tỷ lệ 10 : 1 : 1 : 1 (v/v/v/v). Thể tích tiêm mẫu là 10 µL, tốc độ tiêm 0,2 µL/phút. Verbascoside được phát hiện bằng detector quang phổ tử ngoại (UV) tại bước sóng 254 nm. Độ tích hợp của hệ thống được đánh giá tại nồng độ chất chuẩn verbascoside 3 µg/mL. Kết quả cho thấy vết verbascoside xuất hiện tại giá trị R_f = 0,56 và độ lặp lại của phép đo đạt yêu cầu, với RSD = 1,76%, nhỏ hơn 2%. Hàm lượng verbascoside trong mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn thu được trong khoảng nồng độ khảo sát, với phương trình hồi quy: S = 2196,3C + 2266, hệ số tương quan R^2 = 0,992, trong đó S là diện tích vết sắc ký và C là nồng độ verbascoside trong dung dịch mẫu.

2.3.2. Phương pháp chiết xuất cao Chè vằng

Tiến hành chiết xuất Chè vằng bằng phương pháp chiết siêu âm. Cân chính xác 20,00 gam bột dược liệu Chè vằng cho vào bình nón nút mài 500 ml. Thêm 400 ml dung môi thích hợp vào bình chiết. Tiến hành siêu âm ở nhiệt độ và thời gian phù hợp theo từng thí nghiệm khác nhau. Lọc dịch chiết và tiến hành cô quay ở 60ºC đến khi còn khoảng 50 ml dịch cho vào tủ sấy ở nhiệt độ 50ºC đến hàm ẩm cao dưới 20%.

2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình chiết xuất Chè vằng bằng phương pháp thay đổi một yếu tố OFAT.

Tiến hành khảo sát quy trình chiết siêu âm dược liệu chè vằng ở kích thước dược liệu thô với cùng công suất và số lần chiết (01 lần). Các thông số khảo sát gồm: nồng độ ethanol, tỉ lệ dung môi/dược liệu, thời gian, nhiệt độ chiết xuất. Sử dụng phương pháp thay đổi một yếu tố OFAT, từ đó lựa chọn được 3 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất và khoảng giá trị của từng yếu tố để đưa vào thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa.

2.3.4. Phương pháp thiết kế thí nghiệm Box-Behnken

Ba yếu tố có ảnh hưởng rõ rệt nhất đến hiệu quả chiết xuất được lựa chọn để đưa vào mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) với thiết kế Box–Behnken (BBD). Ba biến độc lập được lựa chọn gồm nồng độ EtOH (X_1, % v/v), thời gian chiết xuất (X_2, phút) và nhiệt độ chiết xuất (X_3, °C), mỗi biến được khảo sát ở 3 mức mã hóa: thấp (-1), trung tâm (0) và cao (+1), tương ứng với nồng độ EtOH là 10 – 25 – 40% (v/v), thời gian chiết 15 – 30 – 45 phút và nhiệt độ chiết 50 – 65 – 80°C (Bảng 1). Hai đáp ứng được khảo sát gồm hiệu suất chiết verbascoside (Y_1, %) và hiệu suất chiết cao (Y_2, %).

Thiết kế thí nghiệm được xây dựng dựa trên phần mềm Design-Expert 13 gồm 12 thí nghiệm tại các điểm khảo sát kết hợp với 4 thí nghiệm lặp lại tại điểm tâm (X_1 = 25%, X_2 = 30 phút, X_3 = 65°C) nhằm đánh giá sai số thực nghiệm và độ ổn định của mô hình, tổng cộng có 16 thí nghiệm được tiến hành theo thứ tự được ngẫu nhiên hóa theo đề xuất của phần mềm nhằm hạn chế ảnh hưởng của các yếu tố ngoại lai và sai số hệ thống. Chi tiết ma trận thiết kế và kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 6.

Mối quan hệ giữa các biến độc lập (X_1, X_2, X_3) và từng đáp ứng (Y_1, Y_2) được mô tả bằng phương trình hồi quy bậc hai đa thức có dạng:

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

Mức độ phù hợp của mô hình được đánh giá thông qua hệ số xác định qua xác định R^2, $R^2_{\text{hiệu chỉnh}}$ và $R^2_{\text{dự đoán}}$, phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định ý nghĩa của các hệ số hồi quy.

2.3.5. Phương pháp tối ưu hóa dựa trên hàm tham vọng

Điều kiện tối ưu của quy trình chiết xuất được xác định bằng phương pháp hàm tham vọng (Desirability Function) trên phần mềm Design-Expert 13. Hai đáp ứng được sử dụng để

tối ưu hóa đồng thời gồm hiệu suất chiết verbascoside (Y_1) và hiệu suất chiết cao (Y_2). Mỗi đáp ứng được chuyển đổi thành giá trị tham vọng riêng lẻ di trong khoảng từ 0 đến 1, trong đó 0 biểu thị đáp ứng không mong muốn và 1 biểu thị đáp ứng đạt mức mong muốn tối đa. Giá trị tham vọng tổng hợp D được xác định theo: $D = (d_1 \times d_2)^{1/2}$

Trong đó: d_1 và d_2 lần lượt là giá trị tham vọng của Y_1 và Y_2. Điều kiện tối ưu được lựa chọn tại giá trị D lớn nhất, đồng thời đảm bảo các giá trị dự đoán của Y_1 và Y_2 đạt yêu cầu. Điều kiện tối ưu do mô hình đề xuất được tiến hành thí nghiệm kiểm chứng và so sánh giữa giá trị thực nghiệm với giá trị dự đoán của mô hình.

Các biến đầu vào được mã hóa thành các giá trị trong khoảng [-1;1] và được tính toán từ giá trị thực tế theo công thức: Nồng độ EtOH: X_1 = (Giá trị thực-25)/15; Thời gian chiết xuất: X_2 = (Giá trị thực-30)/15 và Nhiệt độ chiết xuất: X_3 = (Giá trị thực-65)/15.

Thông số đánh giá

Hiệu suất chiết verbascoside (%) được tính theo công thức:

$$H_{ver}(\%) = \frac{m_{ver\ cao}}{m_{ver\ dl}} \times 100\%$$

$m_{ver\ cao}$: Khối lượng verbascoside trong cao (g);

$m_{ver\ dl}$: Khối lượng verbascoside trong dược liệu (g).

Hiệu suất chiết cao (%) được tính theo công thức:

$$H_{cao}(\%) = \frac{m_{cao} \times (100 - RH_{cao})}{m_{dl} \times (100 - RH_{dl})} \times 100\%$$

m_{cao}: Khối lượng cao thu được (g);

RH_{cao}: Độ ẩm của cao (%);

m_{dl}: Khối lượng dược liệu sử dụng (g);

RH_{dl}: Độ ẩm dược liệu sử dụng (%).

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý dữ liệu bằng phần mềm MS Excel 365. Phần mềm Design Expert 13 để thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa.

Bảng 1. Các mức thí nghiệm sử dụng trong mô hình RSM

Mã hóa	Tên	Đơn vị	Phạm vi nghiên cứu	Mức		
				-1	0	1
X_1	Nồng độ EtOH	% (v/v)	10 – 40	10	25	40
X_2	Thời gian	Phút	15 – 45	15	30	45
X_3	Nhiệt độ	°C	50 – 80	50	65	80

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình chiết xuất verbascoside từ Chè vằng bằng phương pháp thay đổi một yếu tố OFAT

Sau khi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố như tỷ lệ dược liệu/dung môi, nồng độ dung môi, thời gian và nhiệt độ chiết xuất tới quá trình chiết xuất verbascoside từ Chè vằng bằng phương pháp thay đổi một yếu tố dựa trên quy trình chiết xuất có hỗ trợ siêu âm thu được các kết quả như sau:

3.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dược liệu/dung môi

Khi tăng tỷ lệ dược liệu/dung môi từ 1:10 đến 1:30, hiệu suất chiết cao tăng từ 15,71% đến 22,30% và hiệu suất chiết verbascoside tăng từ 31,51% đến 42,25%. Khi tăng tỷ lệ dược liệu/dung môi từ 1:20 đến 1:30 thì hiệu suất chiết tăng lên không đáng kể. Mặt khác tỷ lệ 1:30 sẽ cho khối lượng dịch chiết lớn khi nâng quy mô gây lãng phí dung môi và mất nhiều thời gian cũng như năng lượng để xử lý dịch chiết thành dạng cao. Do đó nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1:20 cho các giai đoạn tiếp theo. Kết quả chi tiết ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dược liệu/dung môi đến hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết verbascoside

Tỷ lệ dược liệu/dung môi	Hiệu suất chiết cao (%)	Hiệu suất chiết verbascoside (%)
1:10	15,71	31,51
1:20	20,64	41,39
1:30	22,30	42,25

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi chiết xuất

Sau khi tiến hành 3 thí nghiệm với các nồng độ EtOH sử dụng lần lượt là 10%, 25%, 40% cho thấy khi nồng độ EtOH tăng từ 10% đến 25% hiệu suất chiết cao hầu như không đổi nhưng hiệu suất chiết verbascoside tăng từ 23,63% đến 42,11%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ EtOH từ 25% đến 40% hiệu suất chiết cao giảm từ 21,40% xuống 17,72%, hiệu suất chiết verbascoside bắt đầu có dấu hiệu giảm. Do đó, nghiên cứu lựa chọn nồng độ EtOH là 10% - 40% đưa vào các thí nghiệm tối ưu để tìm ra được nồng độ EtOH tối ưu nhất trong khoảng trên. Kết quả chi tiết ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ EtOH đến hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết verbascoside

Nồng độ EtOH (%)	Hiệu suất chiết cao (%)	Hiệu suất chiết verbascoside (%)
10%	21,33	23,63
25%	21,40	42,11
40%	17,72	41,11

Ethanol ở các nồng độ khác nhau có mức độ phân cực khác nhau, nồng độ ethanol có độ phân cực tương đương với hoạt chất cần chiết xuất nhất sẽ hòa tan và chiết được hoạt chất đó tốt hơn. Kết quả cho thấy, dung môi EtOH trong khoảng nồng độ thấp từ 25-40% có độ phân cực phù hợp với verbascoside.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết xuất

Với 3 khoảng thời gian chiết xuất được khảo sát là 15 phút, 30 phút, 45 phút nhận thấy khi càng tăng thời gian chiết hiệu suất chiết cao càng tăng (18,34-23,85%) và hiệu suất chiết verbascoside cũng tăng (20,18-50,57%). Kết quả chi tiết ở Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian chiết xuất đến hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết verbascoside

Thời gian	Hiệu suất chiết cao (%)	Hiệu suất chiết verbascoside (%)
15 phút	18,34	20,18
30 phút	21,97	42,15
45 phút	23,85	50,57

Thông thường, hoạt chất cần thời gian để khuếch tán từ dược liệu ra môi trường. Khi đạt cân bằng chiết quá trình khuếch tán sẽ dừng lại. Lúc này, hiệu suất chiết sẽ cao nhất. Mặt khác dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm, thời gian chiết xuất được rút ngắn hơn so với phương pháp chiết tĩnh hoặc chiết hồi lưu, do đó, giá trị cao nhất của thời gian chiết được đề xuất là 45 phút.

3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết xuất

Khi tăng nhiệt độ chiết xuất lần lượt từ 50°C, đến 65°C và 80°C thì hiệu suất chiết cao tăng từ 22,24% đến 24,49% và hiệu suất chiết verbascoside tăng từ 30,46% đến 53,94%. Kết quả chi tiết ở Bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết xuất đến hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết verbascoside

Nhiệt độ	Hiệu suất chiết cao (%)	Hiệu suất chiết verbascoside (%)
50°C	22,24	30,46
65°C	23,53	46,65
80°C	24,49	53,94

Nhiệt độ chiết xuất tăng sẽ làm giảm độ nhớt và sức căng bề mặt của dung môi, tăng tính thấm dung môi vào tế bào dược liệu, đồng thời tăng độ tan, tốc độ khuếch tán hoạt chất từ dược liệu ra dung môi và tăng khuếch tán đối lưu, giúp rút ngắn thời gian chiết và tăng hiệu suất chiết. Nhiệt độ 80°C tuy không làm tăng đáng kể hiệu suất chiết cao nhưng lại cho thấy sự tăng hàm lượng verbascoside rõ rệt. Điều này cho thấy verbascoside tan tốt hơn vào dung môi khi tăng nhiệt độ và tương đối bền với nhiệt. Tuy nhiên, khi chiết ở nhiệt độ rất cao (trên 80°C) làm bay hơi nhanh dung môi ethanol, tăng chi phí sản xuất. Đồng thời nhiệt độ cao có thể gây nguy hiểm khi chiết xuất bằng EtOH nếu thiết bị không đảm bảo độ an toàn. Vì vậy, nghiên cứu giới hạn cận trên của yếu tố nhiệt độ chiết xuất là 80°C và lựa chọn khoảng nhiệt độ từ 50°C đến 80°C để đưa vào thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

Qua kết quả khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố nồng độ EtOH, thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ dược liệu/dung môi bằng phương pháp thay đổi một yếu tố OFAT, các thông số của quy trình chiết

xuất được lựa chọn cố định trong các thí nghiệm là: Tỷ lệ dược liệu/dung môi (1:20)

Đồng thời, khoảng khảo sát các biến đầu vào để xây dựng mô hình trong phương pháp bề mặt đáp ứng RSM được lựa chọn như sau: Dung môi chiết xuất: hỗn hợp ethanol - nước nồng độ từ 10 đến 40%; nhiệt độ chiết xuất: Từ 50 – 80°C; thời gian chiết xuất: 15 – 45 phút.

Bảng 6. Kết quả hàm mục tiêu quy hoạch thực nghiệm

Run	Biến đầu vào mang giá trị thực			Biến đầu vào mang giá trị mã hóa			Hiệu suất chiết verbascoside % (R_1)	Hiệu suất chiết cao % (R_2)
	Nồng độ Ethanol (X_1)	Thời gian (X_2)	Nhiệt độ (X_3)	Nồng độ Ethanol (X_1)	Thời gian (X_2)	Nhiệt độ (X_3)		
1	40	30	50	1	0	-1	254,744	165,337
2	25	15	50	0	-1	-1	72,704	175,277
3	10	30	50	-1	0	-1	127,724	196,547
4	40	45	65	1	1	0	613,844	243,256
5	25	30	65	0	0	0	470,219	229,480
6	25	45	80	0	1	1	541,018	247,159
7	40	15	65	1	-1	0	301,737	168,844
8	25	30	65	0	0	0	436,044	218,029
9	25	45	50	0	1	-1	314,551	232,433
10	25	30	65	0	0	0	449,646	224,111
11	10	30	80	-1	0	1	379,250	227,553
12	25	15	80	0	-1	1	436,279	221,803
13	25	30	65	0	0	0	476,022	230,367
14	40	30	80	1	0	1	567,368	228,563
15	10	15	65	-1	-1	0	174,618	216,218
16	10	45	65	-1	1	0	227,012	228,560

3.2. Mối liên hệ giữa yếu tố ảnh hưởng chính tới đáp ứng trong quá trình chiết xuất verbascoside

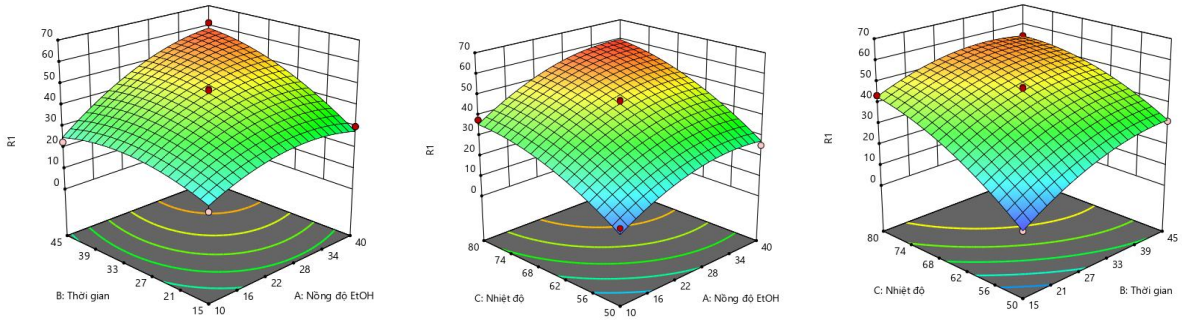
Thí nghiệm tối ưu hóa chiết xuất verbascoside từ dược liệu Chè vằng bằng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm với hỗn hợp dung môi nước : ethanol được thiết kế bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo mô hình Box-Behnken. Phần mềm Design Expert 13 được sử dụng để thiết kế thử nghiệm, phân tích dữ liệu và xây dựng mô hình. Kết quả thiết kế thí nghiệm và thực nghiệm được trình bày ở Bảng 6.

3.2.1. Xây dựng Mô hình tối ưu hóa dựa trên hiệu suất chiết verbascoside (%)

Mô hình có giá trị p-value < 0,001 và giá trị p-value trong phép kiểm định sự không phù hợp (Lack of fit) > 0,05, chứng tỏ rằng sự không phù hợp không có ý nghĩa thống kê. Mô hình có độ tuyến tính và tính bền vững khá cao (R^2 = 0,9844; $R^2_{\text{hiệu chỉnh}}$ = 0,9610). Như vậy, mô hình trên có thể dùng để dự đoán điều kiện chiết xuất verbascoside tối ưu từ dược liệu Chè vằng. Bên cạnh đó, có thể sử dụng mô hình này để xem xét sự ảnh hưởng của từng yếu tố đầu vào đến hiệu suất chiết verbascoside từ dịch chiết. Nồng độ EtOH (X_1), thời gian chiết xuất (X_2), nhiệt độ chiết xuất (X_3) đều có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết verbascoside (Y_1). Dựa trên các yếu tố này, phương trình hồi quy được thiết lập như sau: $Y_1 = - 198,7859 + 0,9122X_1 + 2,4589X_2 + 4,5389X_3 + 0,0289X_1X_2 + 0,0007X_1X_3 – 0,0152X_2X_3 – 0,0306X_1^2 – 0,0266X_2^2 – 0,0253X_3^2$. Kết quả thể hiện ở Bảng 7 và Hình 2.

Bảng 7. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình xây dựng được – hiệu suất chiết verbascosid

Biến số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Phương sai	F – value	P – value
Mô hình	3843,86	9	427,10	42,07	< 0,0001
X_1 - Nồng độ EtOH	859,23	1	859,23	84,64	< 0,0001
X_2 - Thời gian chiết	632,05	1	632,05	62,26	0,0002
X_3 - Nhiệt độ chiết	1665,20	1	1665,20	164,04	< 0,0001
X_1X_2	168,63	1	168,63	16,61	0,0065
X_1X_3	9,33	1	9,33	0,9193	0,3747
X_2X_3	47,00	1	47,00	4,63	0,0749
X_1^2	189,19	1	189,19	18,64	0,0050
X_2^2	143,55	1	143,55	14,14	0,0094
X_3^2	129,68	1	129,68	12,77	0,0117
Phần dư	60,91	6	10,15		
(Lack of Fit)	50,65	3	16,88	4,94	0,1112
Sai số thuần	10,26	3	3,42		
R^2 = 0,9844		$R^2_{\text{hiệu chỉnh}}$= 0,9610		$R^2_{\text{dự đoán}}$= 0,7878	



(1) (2) (3)

Hình 2. Đồ thị tương quan giữa hiệu suất chiết verbascoside và các biến: (1) nồng độ EtOH – thời gian; (2) nồng độ EtOH – nhiệt độ; (3) thời gian – nhiệt độ.

3.2.2. Xây dựng mô hình tối ưu hóa dựa trên hiệu suất chiết cao (%)

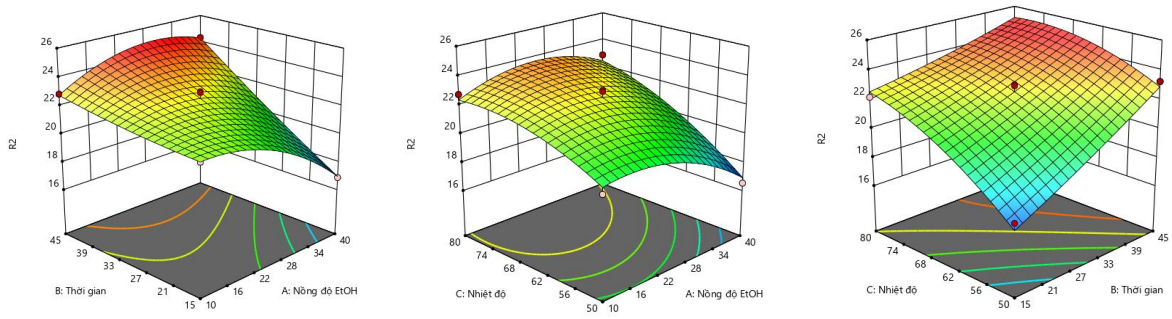
Mô hình có giá trị p-value < 0,001 và giá trị p-value trong phép kiểm định sự không phù hợp (Lack of fit) > 0,05, chứng tỏ rằng sự không phù hợp không có ý nghĩa thống kê. Mô hình có độ tuyến tính và tính bền vững khá cao (R^2 = 0,9758; $R^2_{\text{hiệu chỉnh}}$ = 0,9394). Như vậy, có thể dùng mô hình trên để dự đoán điều kiện chiết xuất thu được khối lượng cao tối ưu từ Chè vằng. Bên cạnh đó, có thể sử dụng mô hình này để xem xét sự ảnh hưởng của từng yếu tố đầu vào đến hiệu suất chiết cao. Nồng độ EtOH (X_1), thời gian chiết xuất (X_2), nhiệt độ chiết xuất (X_3) đều có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết cao (Y_2). Dựa trên các yếu tố này, phương trình hồi quy được thiết lập như sau: Y_2 = - 2,687 - 0,2037X_1 + 0,1531X_2 + 0,6097X_3 + 0,0069X_1X_2 + 0,0036X_1X_3 – 0,0035X_2X_3 – 0,0058X_1^2 + 0,0008X_2^2 - 0,0036X_3^2. Kết quả thể hiện ở Bảng 8 và Hình 3.

Quan sát các biểu đồ trong Hình 2 cho thấy nồng độ EtOH (A) là yếu tố quyết định nhất đến hiệu suất chiết verbascoside. Hiệu suất đạt cực đại tại nồng độ EtOH khoảng 25-30% sau đó có xu hướng giảm nhẹ. Nhiệt độ (C) có tác động mạnh và tương tác rõ rệt với nồng độ EtOH và hiệu suất chiết tối ưu đạt được ở 65-70°C. Thời gian (B) ít ảnh hưởng nhất đến hiệt suất chiết suất, sau 30-35 phút, hiệu suất không tăng đáng kể. Trong khi đó, các biểu đồ trong Hình 3 cho thấy hiệu suất chiết cao (đại diện cho tổng lượng

chất rắn hòa tan) có xu hướng thay đổi khác với hiệu suất chiết verbascoside ở các điều kiện được khảo sát. Hiệu suất chiết cao tối ưu ở nồng độ EtOH là 15% và giảm khi tăng nồng độ EtOH trong khi lại tăng đều khi nhiệt độ chiết xuất càng tăng. Thời gian chiết xuất ít có ảnh hưởng đến hiệu suất chiết cao.

Bảng 8. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình xây dựng được - hiệu suất chiết cao

Biến số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Phương sai	F – value	P – value
Mô hình	95,15	9	10,57	26,85	0,0004
X_1 – Nồng độ EtOH	4,94	1	4,94	12,55	0,0122
X_2 – Thời gian chiết	35,81	1	35,81	90,96	< 0,0001
X_3 – Nhiệt độ chiết	30,22	1	30,22	76,75	0,0001
X_1X_2	9,63	1	9,63	24,46	0,0026
X_1X_3	2,60	1	2,60	6,59	0,0425
X_2X_3	2,53	1	2,53	6,42	0,0444
X_1^2	6,73	1	6,73	17,10	0,0061
X_2^2	0,1150	1	0,1150	0,2920	0,6084
X_3^2	2,58	1	2,58	6,54	0,0430
Phần dư	2,36	6	0,3937		
(Lack of Fit)	1,39	3	0,4632	1,43	0,3882
Sai số thuần	0,9727	3	0,3242		
$R^2 = 0,9758$		$R^2_{\text{hiệu chỉnh}} = 0,9394$		$R^2_{\text{dự đoán}} = 0,7542$	



(1') (2') (3')

Hình 3. Đồ thị tương quan giữa hiệu suất chiết cao và các biến: (1') nồng độ EtOH – thời gian; (2') nồng độ EtOH – nhiệt độ; (3') thời gian – nhiệt độ.

Như vậy, nhiệt độ chiết xuất là yếu tố có ảnh hưởng mạnh trong khi thời gian chiết xuất là yếu tố ít ảnh hưởng đến đồng thời cả 2 chỉ tiêu quan sát là hiệu suất chiết verbascoside và hiệu suất chiết cao. Đối với nồng độ EtOH, khi nồng độ EtOH thấp (khoảng 15%) kết hợp với nhiệt độ chiết xuất cao là điều kiện tối ưu để chiết được nhiều cao, khi tăng nồng độ EtOH thì hiệu suất chiết verbascoside tăng và đạt cực đại ở nồng độ khoảng 25-30% và hiệu suất chiết cao giảm sau đó khi tăng thêm nồng độ EtOH thì cả hiệu suất chiết cao và hiệu suất chiết verbascoside cùng giảm.

3.3. Tối ưu hóa quá trình chiết xuất verbascoside dựa trên hàm tham vọng và thẩm định lại quy trình chiết xuất verbascoside

3.3.1. Tối ưu hóa quá trình chiết xuất dựa trên hàm tham vọng

Với mục tiêu tối ưu là đồng thời thu được Hiệu suất chiết verbascoside và Hiệu suất chiết

cao lớn nhất, hàm mục tiêu được xác định là $Y_1 \rightarrow$ max và $Y_2 \rightarrow$ max. Sử dụng phương pháp Bề mặt đáp ứng trên phần mềm Design Expert 13 để xác định giá trị tối ưu của các biến đầu vào thỏa mãn hàm mục tiêu đề ra. Điều kiện chiết xuất tối ưu hóa dựa trên cả 2 biến phụ thuộc được phần mềm đưa ra là: Nồng độ EtOH: 33,843%; thời gian chiết xuất: 43,315 phút và nhiệt độ chiết xuất: 76,325ºC. Với các thông số này, mô hình toán học dự đoán hiệu suất chiết verbascoside và hiệu suất chiết cao lần lượt là 62,109% và 25,295%.

3.3.2. Thẩm định lại quy trình chiết xuất verbascoside bằng thực nghiệm

Để xác định độ tin cậy của mô hình, các thí nghiệm chiết xuất đã được thực hiện lặp lại ba lần (n=3) trong điều kiện tối ưu được đề xuất là: nồng độ EtOH: 33%; thời gian chiết xuất: 43 phút và nhiệt độ chiết xuất: 76ºC. Kết quả thực nghiệm cho thấy hiệu suất chiết verbascoside và hiệu suất chiết cao trung bình lần lượt là 60,12 ± 1,07 % và 24,46 ± 0,37 % với hàm lượng hoạt chất trong cao thô sau chiết xuất đạt 9,74%. Sự tương thích giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm với sai số nhỏ hơn 4% nằm trong giới hạn cho phép. Mức độ tương đồng giữa dữ liệu dự đoán theo mô hình hồi quy và dữ liệu thực nghiệm cho thấy sự phù hợp của mô hình dự đoán.

Kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng verbascoside trong cao Chè vằng ở điều kiện tối ưu đạt 9,74%, tương đương 2,23% so với dược liệu khô. Giá trị này nằm trong khoảng hàm lượng verbascoside ghi nhận ở cao chiết thô từ lá loài *Lippia javanica* (8,30%) và loài *Lantana camara* (14,1%) trong công bố của Oyourou và cộng sự [9]. Bên cạnh đó, hàm lượng verbascoside 2,23% so với dược liệu khô trong nghiên cứu này có sự tương đồng đáng kể với kết quả của Khound và cộng sự [10] khi sử dụng phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm với hỗn hợp dung môi ethanol:nước để chiết xuất verbascoside từ lá loài *Clerodendrum glandulosum* cho hàm lượng verbascoside biến động từ 2,17–2,26%. Sự tương quan này cho thấy Chè vằng là một nguồn nguyên liệu giàu verbascoside đầy tiềm năng để khai thác và ứng dụng.

Bảng 11. So sánh giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm trong điều kiện tối ưu

Điều kiện tối ưu hóa	Theo dự đoán	Theo thực tế (n=3)
	EtOH 33,843%, thời gian 43,325 phút; nhiệt độ 76,325 ºC	EtOH 33%; thời gian 43 phút; nhiệt độ 76ºC
Hiệu suất chiết verbascoside (%)	62,109	60,12 ± 1,07
Hiệu suất chiết cao (%)	25,295	24,46 ± 0,37
Hàm lượng verbascoside trong cao (%)		9,74

Phương pháp tối ưu hóa sử dụng mô hình Box–Behnken kết hợp phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất nhóm chất phenolic từ thực vật. Kết quả của nghiên cứu cho thấy nồng độ ethanol ở mức 33% là điều kiện dung môi tối ưu để chiết verbascoside từ dược liệu Chè vằng khác biệt so với các hợp chất nhóm phenolic khác khi cần chiết với nồng độ dung môi cao hơn như methanol 76% với loài *Buddleja officinalis* [11], ethanol 69% với bột Yujin [12] hay ethanol 54% v/v với loài *Nephelium lappaceum* [13]. Đây là điểm đặc biệt của nghiên cứu này khi so với các nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất hợp chất phenolic khác đã công bố. Điều này có thể giải thích do nồng độ ethanol thấp phù hợp với đặc tính phân cực cao của verbascoside với nhiều nhóm hydroxyl gắn trên khung đường D-glucose và đường L-rhamnose trong cấu trúc phân tử.

Bên cạnh ưu điểm về sự phù hợp với hoạt chất, ethanol-nước còn là dung môi xanh và an toàn, tuy nhiên, đặc tính phân cực cao của dung môi đồng thời cũng chiết được nhiều hoạt chất hoặc tạp chất phân cực khác ngoài verbascoside từ bộ phận trên mặt đất của dược liệu Chè vằng khiến cho hàm lượng verbascoside trong cao sau khi tiến hành chiết ở điều kiện tối ưu hóa chỉ đạt

là 9,74%. Trong nghiên cứu chiết xuất verbascoside từ lá Ô liu sử dụng phương pháp chiết siêu âm với hỗn hợp dung môi ethanol:methanol của Giacometti và cộng sự [14], hàm lượng verbacoside thu được chỉ đạt 0,036% trên dược liệu khô. Tuy nhiên, khi Deng và cộng sự [15] sử dụng hệ dung môi eutectic (DES) với phương pháp chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (UAE) hoặc chiết xuất phá vách tế bào (WBE) hàm lượng verbascoside trong cao lá Ô liu tăng lên đến nhiều lần lần lượt đạt 1,59% và 1,33%. Mặt khác, Oyourou và cộng sự [9] cũng đã tiến hành quá trình tinh chế verbascoside từ cao thô lá loài *Lippia javanica* bằng phương pháp sắc ký cột silica gel và sắc ký ngược dòng tốc độ cao (HSCCC), kết quả cho hàm lượng verbascoside trong cao tinh chế tăng lên đáng kể so với cao thô ban đầu, lần lượt là 38,84% và 71,02% (hàm lượng verbascoside trong cao thô ban đầu chỉ 8,30%). Các nghiên cứu này cho thấy hàm lượng verbascoside trong cao hoàn toàn có thể được cải thiện thông qua việc tối ưu hóa quy trình chiết xuất và tinh chế cao thô. Bên cạnh điều kiện tối ưu đã khảo sát, việc gia tăng hiệu suất thu hồi verbascoside từ Chè vằng có thể tiếp tục được cải thiện bằng cách tăng số lần chiết, phối hợp các hệ đồng dung môi, chiết xuất có hỗ trợ enzyme hoặc chiết xuất có hỗ trợ vi sóng. Song song đó, đối với cao thô thu được, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào khâu tinh chế, loại tạp chất bằng các phương pháp như chiết phân đoạn với dung môi có độ cực khác nhau, sắc ký cột silica gel hoặc sắc ký hấp phụ trên một số loại nhựa macroporous như AB-8 hoặc D101. Việc tích hợp các kỹ thuật này không chỉ giúp làm giàu hàm lượng verbascoside mục tiêu mà còn nâng cao tính ứng dụng và giá trị thực tiễn cho sản phẩm cao Chè vằng.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng verbascoside trong cao Chè vằng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp quét phổ. Các phép thẩm định đều cho kết quả nằm trong giới hạn yêu cầu. Điều kiện tối ưu hóa chiết xuất verbascoside từ Chè vằng được xác định ở Nồng độ EtOH: 33%, thời gian chiết xuất: 43 phút và nhiệt độ chiết xuất: 76°C. Khi chiết xuất thực nghiệm ở điều kiện tối ưu, thu được hiệu suất chiết verbascoside là 60,12% và hiệu suất chiết cao là 24,46% phù hợp với các kết quả dự đoán từ mô hình. Nghiên cứu đã cung cấp kết quả bước đầu và gợi mở những đề xuất nghiên cứu tiếp theo nhằm nghiên cứu phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ dược liệu Chè vằng.

Tài liệu tham khảo

[1] D. T. Loi, Medicinal Plants and Remedies of Vietnam, Medical Publishing House, Hanoi, 2006, pp. 121 (in Vietnamese).

[2] K. Alipieva, L. Korkina, I. E. Orhan, M. I. Georgiev, Verbascoside - A Review of Its Occurrence, (Bio)Synthesis and Pharmacological Significance, Biotechnology Advances, Vol. 32, No. 6, 2014, pp. 1065-1076, https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001.

[3] L. P. Luhata, T. Usuki, Free Radical Scavenging Activities of Verbascoside and Isoverbascoside from the Leaves of Odontonema strictum (Acanthaceae), Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 59, 2022, Article No. 128528, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128528.

[4] J. H. Chang, H. C. Chuang, G. Hsiao, T. Y. Hou, C. C. Wang, S. C. Huang, B. Y. Li, Y. L. Lee, Acteoside Exerts Immunomodulatory Effects on Dendritic Cells via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Ameliorates Th2-Mediated Allergic Asthma by Inducing Foxp3(+) Regulatory T Cells, International Immunopharmacology, Vol. 106, 2022, pp. 108603-1-108603-12, https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108603.

[5] H. Ma, S. Qin, S. Zhao, Osteoarthritis Is Prevented in Rats by Verbascoside via Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Pathway Downregulation, Medical Science Monitor, Vol. 26, 2020, pp. e921276-1-e921276-6, https://doi.org/10.12659/MSM.921276.

[6] W. Q. Jia, Z. T. Wang, M. M. Zou, J. H. Lin, Y. H. Li, L. Zhang, R. X. Xu, Verbascoside Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation, Migration and Invasion While Promoting Apoptosis Through Upregulation of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 and Inhibition of STAT3 Phosphorylation, Cellular Physiology and Biochemistry, Vol. 47, No. 5, 2018, pp. 1871-1882, https://doi.org/10.1159/000491067.

[7] L. Birkofer, C. Kaiser, U. Thomas, Acteosid und Neoacteosid; Zuckerester aus Syringa vulgaris (L.), Zeitschrift für Naturforschung B, Vol. 23, 2014, pp. 1051-1058, https://doi.org/10.1515/znb-1968-0806.

[8] N. K. T. Linh, D. T. C. Minh, N. T. Hoai, Development of a Method for Quantification of Acteoside in Chè Vằng (Jasminum subtriplinerve) by Thin-Layer Chromatography Combined with Densitometry, Journal of Medicinal Materials, Vol. 23, 2018, p. 240 (in Vietnamese).

[9] J.-N. Oyourou, S. Combrinck, T. Regnier, A. Marston, Purification, Stability and Antifungal Activity of Verbascoside from Lippia javanica and Lantana camara Leaf Extracts, Industrial Crops and Products, Vol. 43, No. 1, 2013, pp. 820-826, https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.028.

[10] P. Khound, H. Sarma, P. P. Sarma, U. K. Jana, R. Devi, Ultrasound-Assisted Extraction of Verbascoside from Clerodendrum glandulosum Leaves for Analysis of Antioxidant and Antidiabetic Activities, ACS Omega, Vol. 8, No. 23, 2023, pp. 20360-20369, https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00173.

[11] G. Xie, R. Li, Y. Han, Y. Zhu, G. Wu, M. Qin, Optimization of the Extraction Conditions for Buddleja officinalis Maxim. Using Response Surface Methodology and Exploration of the Optimum Harvest Time, Molecules, Vol. 22, No. 11, 2017, Article No. 1877, https://doi.org/10.3390/molecules22111877.

[12] L. Jiang, W. Zhang, W. Zhao, Y. Cai, X. Qin, B. Wang, J. Xue, Y. Wen, Y. Wei, Y. Hua, W. Yao, Optimization of Ethanol Extraction Technology for Yujin Powder Using Response Surface Methodology with a Box-Behnken Design Based on Analytic Hierarchy Process-Criteria Importance through Intercriteria Correlation Weight Analysis and Its Safety Evaluation, Molecules, Vol. 28, No. 24, 2023, Article No. 8124, https://doi.org/10.3390/molecules28248124.

[13] S. Klongdee, U. Klinkesorn, Optimization of Accelerated Aqueous Ethanol Extraction to Obtain a Polyphenol-Rich Crude Extract from Rambutan (Nephelium lappaceum L.) Peel as Natural Antioxidant, Scientific Reports, Vol. 12, 2022, Article No. 21153, https://doi.org/10.1038/s41598-022-25818-7.

[14] J. Giacometti, G. Žauhar, M. Žuvić, Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (Olea europaea L.) Using Response Surface Methodology, Foods, Vol. 7, No. 9, 2018, Article No. 149, https://doi.org/10.3390/foods7090149.

[15] Y. Deng, J. Zhou, B. Wang, X. Xu, T. Huang, Z. Xu, C. Zhao, Optimization of Different Extraction Methods for Phenolic Compound Verbascoside from Chinese Olea europaea Leaves Using Deep Eutectic Solvents: Impact on Antioxidant and Anticancer Activities, Molecules, Vol. 29, No. 17, 2024, Article No. 4219, https://doi.org/10.3390/molecules29174219.