Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2026.227

TỐI ƯU HÓA CHIẾT XUẤT POLYPHENOL CÓ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA VÀ ỨC CHẾ A-GLUCOSIDASE TỪ LÁ ỔI RỪNG (*Psidium guajava* L.) BẰNG CHIẾT XUẤT LỎNG ÁP SUẤT CAO

Đặng Thị Ngọc Dung[1,2], Nguyễn Minh Trung[1,3] và Nguyễn Quang Vinh[1,*]
[1]*Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam*
[2]*Khoa Công nghệ Hóa học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghệ Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam*
[3]*Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam*
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): nqvinh@ttn.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 11/02/2026
Sửa bài (Revised): 13/03/2026
Duyệt đăng (Accepted): 16/09/2026

Title: *Optimization of the extraction of polyphenols with antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities from wild guava leaves (Psidium guajava L.) using pressurized liquid extraction*

Author(s): *Dang Thi Ngoc Dung[1,2], Nguyen Minh Trung[1,3] and Nguyen Quang Vinh[1,*]*

Affiliation(s): *[1]Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak Province, Viet Nam; [2]Faculty of Chemical and Food Technology, Ho Chi Minh City University of Technology and Engineering, Ho Chi Minh City, Viet Nam; [3]Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen University, Dak Lak Province, Viet Nam*

TÓM TẮT

Nhằm khai thác polyphenol có hoạt tính sinh học từ lá ổi rừng (Psidium guajava L.), nghiên cứu ứng dụng chiết xuất lỏng áp suất cao (PLE) kết hợp phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) với thiết kế tâm xoay (CCD) để tối ưu hóa đồng thời hàm lượng polyphenol tổng (TPC), hoạt tính DPPH và ức chế α-glucosidase (IC50). Ba yếu tố khảo sát gồm nồng độ ethanol (34,75-65,25%), nhiệt độ (64,75–95,25 °C) và thời gian chiết (2,375-17,625 phút). Các mô hình bậc hai có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$), với lack-of-fit không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Điều kiện tối ưu gồm 49,03% ethanol, 79,58 °C và 9,21 phút (hàm mong muốn 97,6%). Khi đó, TPC, DPPH và IC_{50} thực nghiệm lần lượt đạt 240,113 ± 3,792 mg GAE/g chất khô, 408,831 ± 8,425 mg TE/g chất khô và 3,146 ± 0,387 µg/mL. Phân tích tương quan Pearson và phân tích thành phần chính (PCA) cho thấy TPC tương quan thuận với DPPH ($r = 0,94$) và nghịch với IC_{50} ($r = −0,95$). Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng PLE để thu nhận polyphenol có hoạt tính sinh học từ lá ổi rừng.

Từ khóa: *Chiết xuất lỏng áp suất cao, hoạt tính trung hòa gốc tự do, hợp chất phenolic, lá ổi rừng, phương pháp bề mặt đáp ứng, tiềm năng kháng đái tháo đường*

ABSTRACT

*To recover bioactive polyphenols from wild guava (*Psidium guajava *L.) leaves, this study employed pressurized liquid extraction (PLE) combined with response surface methodology (RSM) using a central composite design (CCD) to simultaneously optimize total phenolic content (TPC), DPPH radical-scavenging activity, and α-glucosidase inhibitory activity (IC_{50}). The effects of ethanol concentration (34.75-65.25%), extraction temperature (64.75-95.25 °C), and extraction time (2.375-17.625 min) were investigated. The quadratic models were statistically significant ($p < 0.0001$), with nonsignificant lack-of-fit ($p > 0.05$). The optimal extraction conditions were 49.03% ethanol, 79.58 °C, and 9.21 min, with an overall desirability of 97.6%. Under these conditions, the experimentally determined TPC, DPPH activity, and α-glucosidase inhibitory IC_{50} were 240.113 ± 3.792 mg GAE/g dry weight, 408.831 ± 8.425 mg TE/g dry weight, and 3.146 ± 0.387 µg/mL, respectively. Pearson correlation analysis and principal component analysis (PCA) revealed a positive correlation between TPC and DPPH activity ($r = 0.94$) and a negative correlation between TPC and IC_{50} ($r = -0.95$). These findings highlight the potential of PLE for recovering bioactive polyphenols from wild guava leaves.*

Keywords: *Antidiabetic potential, phenolic compounds, pressurized liquid extraction, Psidium guajava leaves, radical scavenging activity, response surface methodology*

1. GIỚI THIỆU

Lá ổi rừng (*Psidium guajava* L.), là nguyên liệu được sử dụng trong y học dân gian cho nhiều mục đích khác nhau, bao gồm điều trị tiêu chảy, cải thiện các rối loạn dạ dày và hỗ trợ kiểm soát đường huyết ở người mắc bệnh đái tháo đường. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, lá ổi rừng giàu các hợp chất polyphenol, trong đó, các thành phần chính gồm gallic acid, catechin, rutin, quercetin, apigenin, quercitrin, vitexin và apigenin-7-O-D-glucopyranoside (Nguyen et al., 2022; Nguyen et al., 2023), cũng như các hợp chất chlorophyll và carotentoids (Nguyen et al., 2023). Đồng thời, cao chiết lá ổi rừng thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa và hỗ trợ ổn định đường huyết tiềm năng (Nguyen et al., 2017). Điều đó cho thấy, đây là nguồn nguyên liệu tự nhiên có tiềm năng ứng dụng trong hỗ trợ kiểm soát đường huyết trong bệnh đái tháo đường.

Phương pháp chiết xuất có hỗ trợ sóng siêu âm (UAE) đã được áp dụng trong các nghiên cứu trước nhằm thu nhận các hợp chất này từ lá ổi rừng với hiệu suất tốt và tính thân thiện với môi trường (Dang et al., 2024). Tuy nhiên, hiệu quả chiết vẫn phụ thuộc mạnh vào điều kiện và phương pháp chiết xuất. Vì vậy, trong nghiên cứu này, phương pháp chiết xuất lỏng áp suất cao (Pressurized Liquid Extraction - PLE) được lựa chọn để tiếp tục khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện chiết xuất xanh. PLE cho phép tăng cường khả năng khuếch tán dung môi, rút ngắn thời gian chiết và nâng cao hiệu suất thu hồi các hợp chất phenolic, qua đó hướng tới thu được dịch chiết lá ổi rừng giàu hoạt tính chống oxy hóa và chống đái tháo đường (Chemat et al., 2020; Lefebvre et al., 2021; Le et al., 2024).

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) được sử dụng rộng rãi để thiết kế, phân tích và dự đoán các điều kiện chiết xuất tối ưu, nhờ khả năng đánh giá đồng thời sự tương tác giữa các biến, vượt trội hơn so với phương pháp khảo sát từng yếu tố riêng lẻ (Koraqi et al., 2023). Trong đó, thiết kế tâm xoay (Central Composite Design – CCD) là một công cụ thống kê hiệu quả giúp xây dựng mô hình dự đoán và làm rõ mối quan hệ giữa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết.

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian chiết xuất các hợp chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa và khả năng ức chế α-glucosidase từ lá ổi rừng (*Psidium guajava* L.) bằng phương pháp chiết xuất lỏng áp suất cao (PLE). Thông qua CCD, các thông số bao gồm nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian chiết xuất được tối ưu hóa dựa trên hàm lượng polyphenol tổng, hoạt tính chống oxy hóa và khả năng ức chế α-glucosidase.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu

Folin - Ciocalteu, natri cacbonat, natri bicacbonat, quercetin, gallic acid, Trolox, DPPH, p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside, α-glucosidase và methanol được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetic acid, ethanol được cung cấp bởi Xilong Scientific Co., Ltd (Guangdong, Trung Quốc). Các hóa chất và thuốc thử khác đạt tiêu chuẩn phân tích, bao gồm $NaNO_2$, $AlCl_3$, NaOH, Na_2HPO_4, $NaH_2PO_4.2H_2O$, $CaCl_2$, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), kali natri tartrat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$).

Lá ổi rừng (*Psidium guajava* L) được thu hái là lá ổi già (lá thứ 3 tính từ búp lá trở xuống) tại rừng huyện M'Drak, tỉnh Đắk Lắk vào tháng 12 năm 2023. Lá ổi sau khi thu hái được lựa chọn những lá không bị sâu bệnh và rửa sạch, để ráo và sấy khô trong bằng tủ sấy đối lưu ở 50 °C đến khi hàm lượng độ ẩm < 9 % (Nguyen et al., 2022). Tiếp theo, mẫu khô được nghiền thành bột mịn bằng máy nghiền, bột nghiền qua rây đường kính 2 mm và được bảo quản trong hộp kín ở -20°C đến khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất lỏng áp suất cao (PLE)

Bột lá ổi rừng 1,5 g và 10 g cát được cân, nhồi vào ống chiết của thiết bị Speed Extractor Buchi-E916. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được cố định ở mức 1/10 (g/mL). Để đảm bảo hệ dung môi được duy trì hoàn toàn ở pha lỏng trong khoảng nhiệt độ khảo sát (64,75 ÷ 95,25°C), áp suất hệ thống được vận hành cố định ở 130 bar (Hirondart et al., 2020; Višnjevec et al., 2024). Việc cố định áp suất tĩnh nhằm loại trừ thông số này khỏi không gian tối ưu hóa, do động học khuếch tán polyphenol trong pha lỏng không chịu sự chi phối có ý nghĩa bởi sự biến thiên áp suất (Santos et al., 2012). Các thông số khảo sát động gồm nhiệt độ, nồng độ ethanol và thời gian chiết được thiết lập theo thiết kế bề mặt đáp ứng tại Bảng 2. Dịch chiết thu nhận được lưu trữ ở -20°C cho các phân tích tiếp theo.

2.2.2. Phân tích các chỉ tiêu hóa học và hoạt tính sinh học

Các chỉ tiêu theo dõi: Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC), hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH

và khả năng ức chế α-glucosidase của chiết xuất lá ổi rừng.

2.2.3. Thiết kế thí nghiệm

Thiết kế thí nghiệm kiểu tâm xoay (Central Composite Design – CCD) bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để xây dựng mô hình thực nghiệm với ba yếu tố và năm mức: nồng độ ethanol (34,75 ÷ 65,25% trong nước cất), nhiệt độ chiết xuất (64,75 ÷ 95,25°C) và thời gian chiết xuất (2,375 ÷ 17,625 phút) được xác định từ các thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố. Tổng số 20 nghiệm thức được thực hiện theo Bảng 2. Phần mềm Thống kê (Design Expert 12) được sử dụng để thiết kế thực nghiệm. Phương trình phản hồi bậc hai toán học như sau: $Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k}\beta_{ii}X^2_i + \sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k}\beta_{ij}X_iX_j$; trong đó Y đại diện cho giá trị đáp ứng, bao gồm TPC, hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH, cũng như khả năng ức chế α-glucosidase. β_0 đại diện cho hệ số chặn của mô hình, trong khi βi, βii và βij biểu thị các hệ số tuyến tính, bậc hai và tương tác, tương ứng. Xi và Xj đại diện cho biến mã hóa độc lập, với k là số lượng biến.

2.2.4. Xử lý số liệu

Phân tích được thực hiện ở ba lần lặp lại và các kết quả thực nghiệm được lấy giá trị trung bình với độ lệch chuẩn tương ứng của chúng. Kết quả tối ưu hóa chiết xuất được đánh giá bằng phần mềm thống kê (Design Expert 12, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Dữ liệu thực nghiệm phù hợp với mô hình đa thức bậc hai và các hệ số hồi quy. Ý nghĩa của mô hình toán học được xác thực bằng phân tích phương sai (ANOVA), cho phép xác định các hệ số hồi quy tuyến tính, bậc hai và tương tác cho mỗi phản hồi. Ý nghĩa thống kê của tất cả các hạng đa thức được đánh giá bằng cách tính toán giá trị F ở xác suất (giá trị P) là 0,05. Điểm tối ưu được xác định thông qua ứng dụng với mục tiêu tối đa hóa tất cả các phản hồi. Phân tích thành phần chính (PCA) được thực hiện bằng phần mềm Origin 2025b và vẽ bằng phần mềm R.

Bảng 1. Chỉ tiêu và phương pháp phân tích

Chỉ tiêu	Phương pháp phân tích
TPC (mg GAE/g ck)	Phương pháp so màu với gallic acid làm chất chuẩn, thuốc thử Folin-Ciocalteu như chất oxy hóa, xác định màu tại bước sóng 765 nm (Nguyen et al., 2022)
DPPH (mg TE/g ck)	Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa DPPH (Nguyen et al., 2022)
Hoạt tính ức chế α-glucosidase (IC_{50}, µg/mL)	Phương pháp xác định hoạt tính ức chế α-glucosidase (Nguyen et al., 2022)

Bảng 2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm mã hóa các biến độc lập theo thiết kế RSM - CCD

STT	Biến thực			Biến mã hóa		
	Nồng độ Ethanol, X_1 (%)	Nhiệt độ, X_2 (°C)	Thời gian, X_3 (phút)	U_1	U_2	U_3
1	40	70	5	-1	-1	-1
2	60	70	5	+1	-1	-1
3	40	90	5	-1	+1	-1
4	60	90	5	+1	+1	-1
5	40	70	15	-1	-1	+1
6	60	70	15	+1	-1	+1
7	40	90	15	-1	+1	+1
8	60	90	15	+1	+1	+1
9*	34,75	80	10	-α	0	0
10*	65,25	80	10	+α	0	0
11*	50	64,75	10	0	-α	0
12*	50	95,25	10	0	+α	0
13*	50	80	2,375	0	0	-α
14*	50	80	17,625	0	0	+α
15[c]	50	80	10	0	0	0
16[c]	50	80	10	0	0	0
17[c]	50	80	10	0	0	0
18[c]	50	80	10	0	0	0
19[c]	50	80	10	0	0	0
20[c]	50	80	10	0	0	0

Bảng 3. Điều kiện thí nghiệm cho thiết kế RSM – CCD và kết quả về TPC, hoạt tính chống oxy hóa DPPH và ức chế α-glucosidase của chiết xuất lá ổi rừng

Stt	Các mức khảo sát			Các mục tiêu		
	Nồng độ ethanol, X_1 (%)	Nhiệt độ, X_2 (°C)	Thời gian, X_3 (phút)	TPC, Y_1 (mg GAE/g ck)	DPPH, Y_2 (mg TE/mg ck)	ức chế α-glucosidase, Y_3 (IC_{50}, µg/mL)
1	40	70	5	197,295 ± 1,477	311,229 ± 7,467	4,662 ± 0,065
2	60	70	5	191,800 ± 1,293	293,564 ± 2,496	4,675 ± 0,058
3	40	90	5	197,498 ± 1,309	331,372 ± 9,564	4,680 ± 0,026
4	60	90	5	202,063 ± 1,791	319,186 ± 5,429	4,609 ± 0,062
5	40	70	15	190,159 ± 3,058	338,158 ± 12,798	5,400 ± 0,071
6	60	70	15	180,789 ± 2,279	310,634 ± 5,509	5,482 ± 0,103
7	40	90	15	176,768 ± 3,394	289,697 ± 4,759	6,043 ± 0,108
8	60	90	15	179,599 ± 4,262	263,402 ± 3,072	6,098 ± 0,074
9*	34,75	80	10	209,076 ± 2,600	365,701 ± 3,391	4,248 ± 0,061
10*	65,25	80	10	202,043 ± 2,861	344,478 ± 5,574	4,196 ± 0,030
11*	50	64,75	10	205,644 ± 3,695	335,793 ± 10,683	4,313 ± 0,064
12*	50	95,25	10	207,571 ± 2,832	300,648 ± 4,392	4,856 ± 0,073
13*	50	80	2,375	204,190 ± 5,669	304,634 ± 12,918	4,742 ± 0,044
14*	50	80	17,625	175,383 ± 2,591	282,611 ± 13,039	6,336 ± 0,049
15c	50	80	10	242,768 ± 1,939	414,981 ± 1,939	3,276 ± 0,084
16c	50	80	10	243,224 ± 3,061	413,899 ± 6,418	3,298 ± 0,031
17c	50	80	10	241,160 ± 2,757	424,105 ± 5,564	3,319 ± 0,150
18c	50	80	10	243,198 ± 1,567	414,757 ± 12,795	3,331 ± 0,051
19c	50	80	10	241,489 ± 2,373	415,224 ± 6,896	3,298 ± 0,106
20c	50	80	10	243,301 ± 4,565	423,014 ± 8,591	3,329 ± 0,059

*Chú thích: Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± SD (n = 3); Thí nghiệm 1-8: Các điểm thí nghiệm của thiết kế toàn phần; * Điểm trục; c: Điểm trung tâm; TPC: tổng hàm lượng phenolic; GAE: tương đương gallic acid; IC_{50}: Nồng độ mẫu cần thiết để ức chế 50% hoạt tính của enzyme α-glucosidase; ck: chất khô*

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

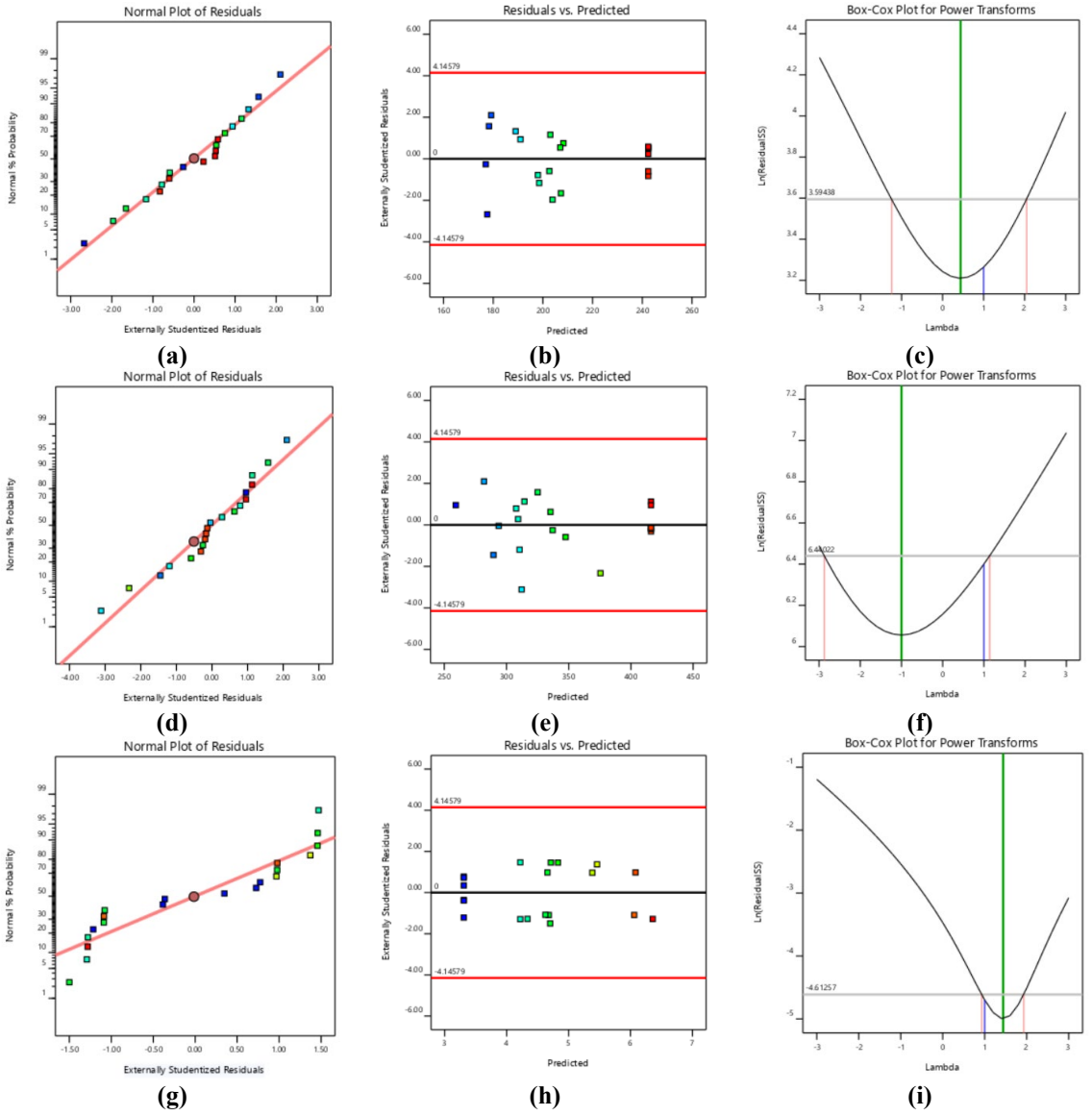
3.1. 3.1. Mô hình hóa và phân tích thống kê quá trình chiết xuất polyphenol bằng phương pháp RSM - CCD

Thiết kế tâm xoay (CCD) trong khuôn khổ RSM được sử dụng để mô hình hóa ảnh hưởng đồng thời của nồng độ ethanol (X_1: 34,75 ÷ 65,25%), nhiệt độ chiết (X_2: 64,75 ÷ 95,25°C) và thời gian chiết (X_3: 2,375 ÷ 17,625 phút) đến ba hàm mục tiêu: Hàm lượng polypenol tổng số (TPC, mg GAE/g ck), hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH (DPPH, mg TE/g ck) và khả năng ức chế α-glucosidase (IC_{50}, µg/mL). Các nghiệm thức (20 điểm) cho thấy hàm mục tiêu biến thiên rộng: TPC 175,383 ± 2,591 đến 243,301 ± 4,565 mg GAE/g ck; DPPH 263,402 ± 3,072 đến 424,105 ± 5,564 mg TE/g ck và giá trị IC_{50} 3,276 ± 0,084 đến 6,336 ± 0,049 µg/mL, phản ánh mức nhạy cao của quá trình PLE với điều kiện vận hành, phù hợp với các nghiên cứu PLE trên nguyên liệu giàu polyphenol khác như bã nho, lá trà xanh và lá mướp đắng (Pereira et al., 2019; Le et al., 2024; Rocha et al., 2025).

Phân tích phương sai (ANOVA) xác nhận mô hình bậc hai có ý nghĩa thống kê cho cả ba hàm mục tiêu ($p < 0,0001$), đồng thời lack-of-fit không có ý nghĩa ($p > 0,05$), cho thấy mô hình phù hợp với dữ liệu thực nghiệm. Các chỉ số R^2 cao và CV thấp cho thấy độ chính xác và tính lặp lại tốt: TPC R^2 = 0,9978; CV = 0,77%; Adeq Precision = 57,1967; DPPH R^2 = 0,9891; CV = 2,25%; Adeq Precision = 28,5949; IC_{50} R^2 = 0,9995; CV = 0,67%; Adeq Precision = 142,9699 (Bảng 5), cho thấy mô hình có độ chính xác và khả năng dự báo tốt, đáp ứng các tiêu chí đánh giá mô hình RSM đã được khuyến nghị trong nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất các hợp chất từ thực vật (Montgomery, 2017; Sarker & Nahar, 2024). Đáng chú ý, R^2 dự đoán phù hợp với R^2 điều chỉnh (độ chênh lệch nhỏ hơn 0,2), củng cố khả năng sử dụng mô hình dự đoán tối ưu cho thực tế.

Bên cạnh đó, các biểu đồ chẩn đoán mô hình (Hình 1) phản ánh chi tiết và toàn diện độ tin cậy

của phương trình hồi quy. Biểu đồ xác suất chuẩn của phần dư (Normal Plot of Residuals) (Hình 1a, 1d, 1g) cho thấy các điểm dữ liệu phân bố bám sát đường thẳng, xác nhận sai số tuân theo phân phối chuẩn. Đồng thời, biểu đồ phần dư theo giá trị dự đoán (Residuals vs. Predicted) (Hình 1b, 1e, 1h) thể hiện sự phân tán hoàn toàn ngẫu nhiên, không tạo thành quy luật hình học cụ thể (hình phễu hay đường cong), minh chứng cho thấy phương sai của sai số là đồng nhất và độc lập. Bên cạnh đó, biểu đồ Box-Cox (Hình 1c, 1f, 1i) chỉ ra giá trị λ (lambda) luôn nằm trong khoảng tin cậy 95%. Điều này khẳng định dữ liệu gốc không yêu cầu thực hiện phép biến đổi toán học (data transformation). Sự hội tụ của ba yếu tố chẩn đoán hình học này, kết hợp với giá trị R^2pre đạt mức cao, minh chứng cho mô hình toán học vững chắc, khẳng định năng lực dự báo chính xác của phương trình hồi quy và loại trừ hoàn toàn rủi ro xảy ra hiện tượng overfitting.



Hình 1. Các biểu đồ chẩn đoán mô hình (Diagnostic plots): Normal Plot of Residuals, Residuals vs. Predicted và Box-Cox Plot tương ứng với các biến đáp ứng: hàm lượng polyphenol tổng TPC (a, b, c), hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH (d, e, f) và hoạt tính ức chế α-glucosidase IC_{50} (g, h, i) của cao chiết lá ổi rừng

Bảng 4. Phân tích phương sai cho các biến độc lập nghiên cứu trong chiết xuất lá ổi rừng theo các nghiệm thức

Source	TPC, Y_1			DPPH, Y_2			IC_{50}, Y_3		
	Sum of Squares	**F-value**	**p-value**	**Sum of Squares**	**F-value**	**p-value**	**Sum of Squares**	**F-value**	**p-value**
Model	11602,41	493,06	< 0,0001	54768,83	101,08	< 0,0001	19,07	2325,22	< 0,0001
X_1-Nồng độ ethanol.	26,17	10,01	0,0101	1064,29	17,68	0,0018	8,599E-08	0,0001	0,9924
X_2-Nhiệt độ chiết	0,1094	0,0418	0,8420	847,16	14,07	0,0038	0,3284	360,49	< 0,0001
X_3- Thời gian chiết	875,97	335,03	< 0,0001	598,95	9,95	0,0103	3,68	4043,64	< 0,0001
X_1X_2	61,94	23,69	0,0007	5,62	0,0934	0,7662	0,0015	1,69	0,2223
X_1X_3	3,93	1,50	0,2481	71,82	1,19	0,3003	0,0047	5,17	0,0463
X_2X_3	78,42	29,99	0,0003	2501,37	41,55	< 0,0001	0,2135	234,37	< 0,0001
X_1^2	2640,46	1009,90	< 0,0001	5976,50	99,27	< 0,0001	1,66	1824,53	< 0,0001
X_2^2	2490,36	952,49	< 0,0001	16755,22	278,31	< 0,0001	3,25	3564,41	< 0,0001
X_3^2	5430,07	2076,84	< 0,0001	26969,90	447,98	< 0,0001	9,93	10899,30	< 0,0001
Residual	26,15			602,03			0,0091		
Lack of Fit	21,61	4,76	0,0560	496,14	4,69	0,0577	0,0068	2,94	0,1306
Pure Error	4,54			105,89			0,0023		
Cor Total	11628,56			55370,86			19,08		

Ghi chú: TPC: tổng hàm lượng phenolic; Giá trị p < 0,05 chỉ ra các hạng mô hình có ý nghĩa; Giá trị p của Lack of Fit > 0,05 ngụ ý Lack of Fit không ý nghĩa so với lỗi thuần túy. Lack of Fit không ý nghĩa là tốt

Về mức độ ảnh hưởng của các yếu tố (dựa trên *F-value*) cho cho thấy, thời gian chiết (X_3) là biến chi phối mạnh đối với TPC và đặc biệt đối với IC_{50}, trong khi nồng độ ethanol (X_1) thể hiện ảnh hưởng tuyến tính nổi bật hơn đối với DPPH. Kết quả này phù hợp với bản chất của PLE là tăng cường khả năng truyền khối giúp giải phóng hợp chất polyphenol nhanh, nhưng nếu kéo dài thời gian, sử dụng nhiệt độ cao có thể làm suy giảm một phần các hợp chất nhạy nhiệt dẫn đến làm giảm hoạt tính sinh học.

3.2. Ảnh hưởng của các thông số chiết xuất bằng PLE lên TPC, hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH và khả năng ức chế α-glucosidase

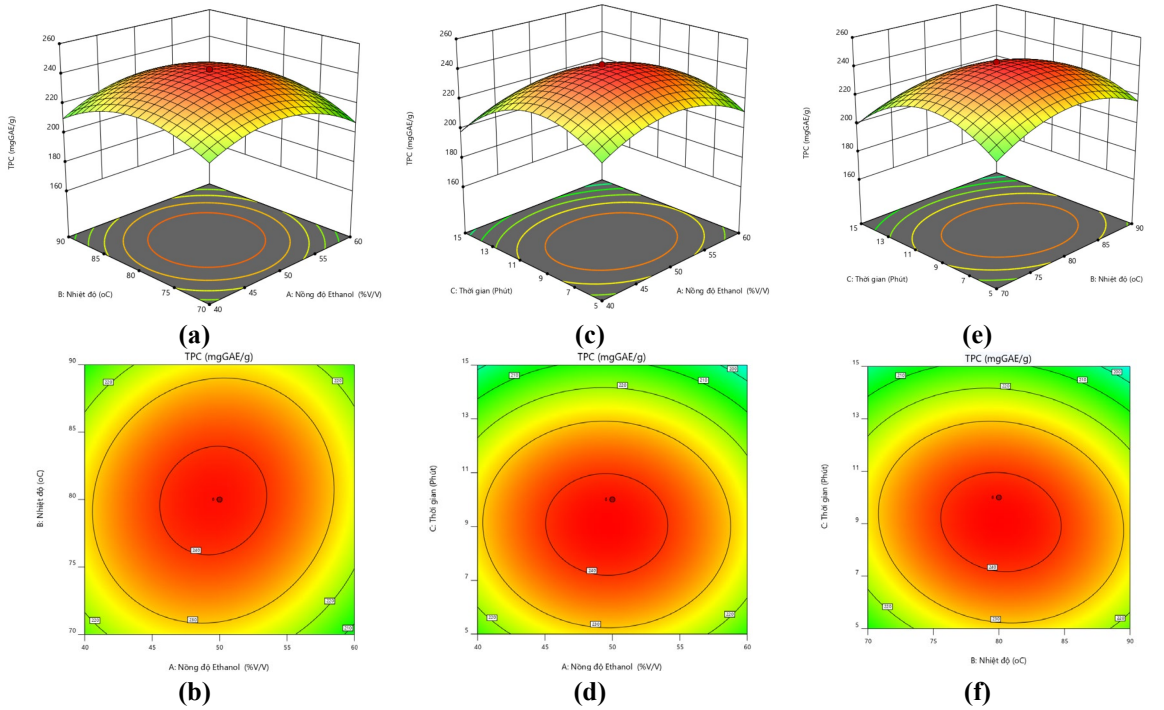
(i) Nồng độ ethanol (X_1): Tỷ lệ ethanol - nước với nồng độ phù hợp được ghi nhận là lựa chọn tối ưu cho chiết xuất polyphenol do tạo ra độ phân cực phù hợp với phổ hợp chất polyphenol đa dạng trong nguyên liệu thực vật (Chemat et al., 2020; Lefebvre et al., 2021). Vùng tối ưu nằm trong khoảng từ 49 ÷ 50% ethanol trong nghiên cứu này thể hiện xu hướng phi tuyến đặc trưng, đã được công bố trong nhiều nghiên cứu về PLE và tối ưu RSM khác, trong đó nồng độ ethanol quá thấp hạn chế hòa tan flavonoid kém phân cực, trong khi nồng độ ethanol quá cao làm giảm khả năng trích ly các polyphenol ưa nước (Pereira et al., 2019; Rocha et al., 2025). Do đó, sự suy giảm TPC, DPPH và sự gia tăng giá trị IC_{50} tại các mức ethanol biên là hệ quả của mất cân bằng độ phân cực của dung môi và hợp chất.

(ii) Nhiệt độ chiết (X_2): Nhiệt độ là yếu tố quan trọng thúc đẩy động học truyền khối trong PLE thông qua việc giảm độ nhớt dung môi và tăng khả năng khuếch tán của hợp chất mục tiêu. Tuy nhiên, các nghiên cứu tổng quan về PLE đã chỉ ra rằng nhiệt độ cao cũng là yếu tố giới hạn, do có thể gây oxy hóa hoặc phân hủy các hợp chất polyphenol nhạy nhiệt (Lefebvre et al., 2021). Xu hướng TPC và DPPH tăng trong khoảng nhiệt độ trung bình, sau đó giảm khi nhiệt độ tiến gần biên cao trong nghiên cứu này, là hoàn toàn phù hợp với các công bố trước

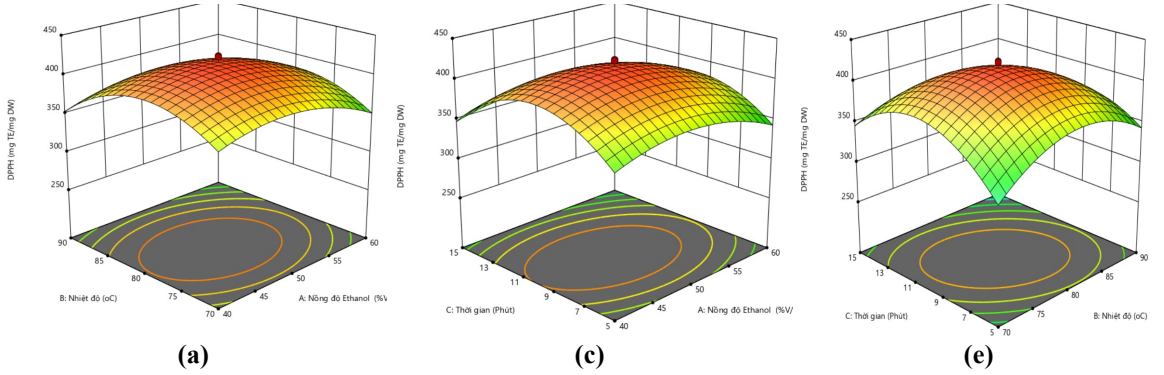
đó trên nhiều nguồn thực vật giàu polyphenol khác nhau (Pereira et al., 2019; Le et al., 2024).

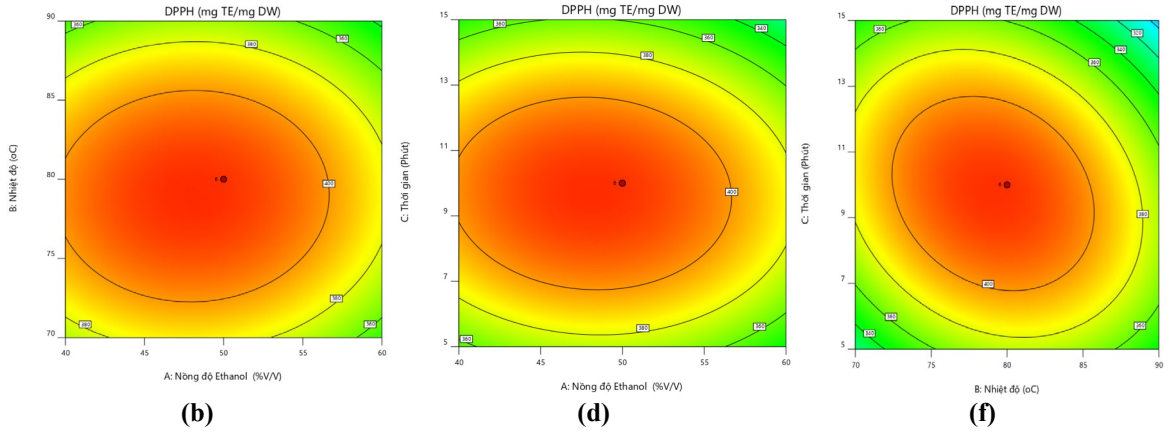
(iii) Thời gian chiết (X_3): Thời gian chiết xuất thể hiện ảnh hưởng mạnh nhất đến TPC và đặc biệt đến giá trị IC_{50}, như phản ánh qua giá trị F cao trong bảng phân tích phương sai (Bảng 4). Điều này phù hợp với bản chất của PLE, trong đó thời gian ngắn đủ để đạt cân bằng truyền khối nhờ tác động kết hợp của nhiệt và áp suất, trong khi kéo dài thời gian chiết có thể làm tăng tiếp xúc nhiệt và thúc đẩy các phản ứng thoái hóa hoặc đồng chiết các cấu tử không mong muốn, làm suy giảm hoạt tính sinh học (Chemat et al., 2020; Lefebvre et al., 2021).

Các tương tác giữa nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian (Hình 2 - 4) cho thấy vùng đáp ứng tối ưu tập trung tại các mức trung gian, trong khi các tổ hợp biên tạo ra tác động cộng hưởng bất lợi lên độ ổn định của polyphenol. Xu hướng này đã được ghi nhận trong các nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất bằng RSM, nơi các điều kiện trung gian thường mang lại hiệu suất chiết và hoạt tính sinh học cao nhất (Sarker & Nahar, 2024).

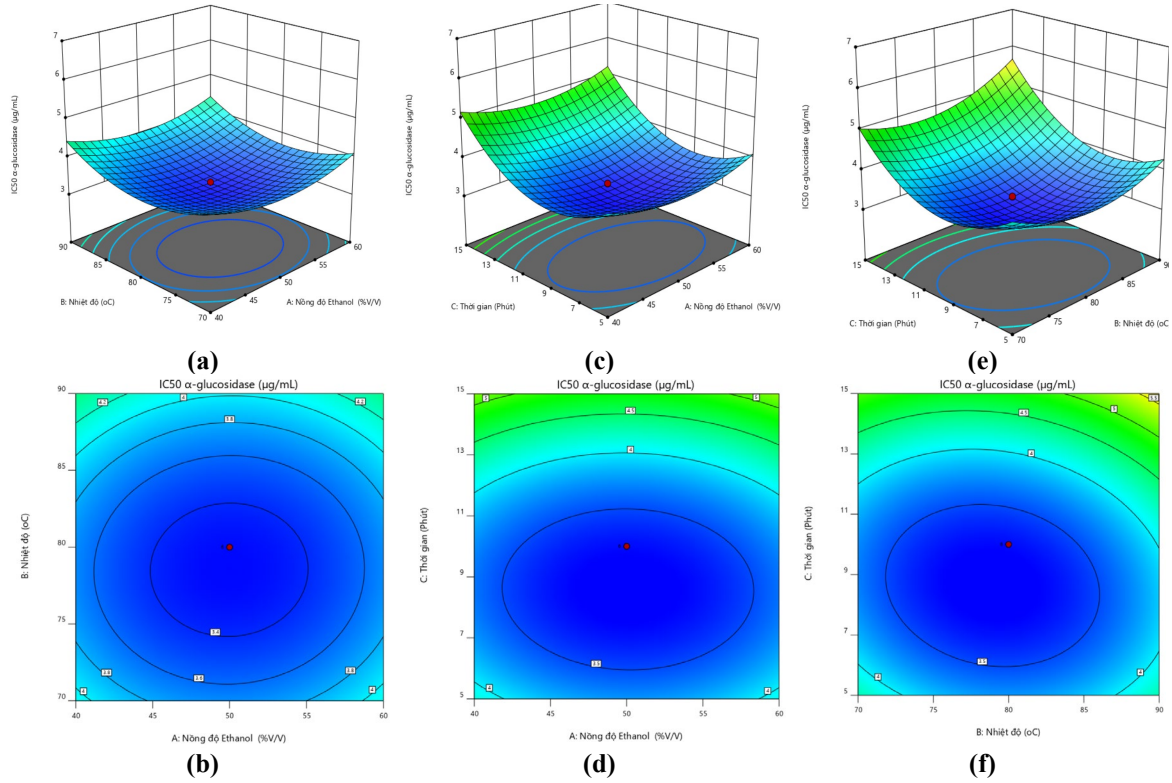


Hình 2. Biểu đồ bề mặt (a, c, e) và đường đồng mức (b, d, f) minh họa tác động tương tác của nồng độ ethanol và nhiệt độ chiết xuất (a & b), nồng độ ethanol và thời gian chiết xuất (c & d), nhiệt độ chiết xuất và thời gian chiết xuất (e & f) đến TPC của chiết xuất lá ổi rừng





Hình 3. Biểu đồ bề mặt (a, c, e) và đường đồng mức (b, d, f) minh họa tác động tương tác của nồng độ ethanol và nhiệt độ chiết xuất (a & b), nồng độ ethanol và thời gian chiết xuất (c & d), nhiệt độ chiết xuất và thời gian chiết xuất (e & f) đến hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH của chiết xuất lá ổi rừng



Hình 4. Biểu đồ bề mặt (a, c, e) và đường đồng mức (b, d, f) minh họa tác động tương tác của nồng độ ethanol và nhiệt độ chiết xuất (a & b), nồng độ ethanol và thời gian chiết xuất (c & d), nhiệt độ chiết xuất và thời gian chiết xuất (e & f) đến khả năng ức chế α-glucosidase (IC_{50}) của chiết xuất lá ổi rừng

Tương tác giữa các biến (Hình 2 - 4): Các đồ thị bề mặt và đường đồng mức cho thấy vùng đáp ứng tốt nhất thường nằm ở mức trung gian của ethanol và thời gian chiết, kết hợp với nhiệt độ trung bình khá; trong khi các tổ hợp biên (nhiệt độ cao + thời gian dài hoặc ethanol cao + thời gian dài) dễ làm suy giảm đáp ứng do cộng hưởng bất lợi lên độ ổn định của hợp chất polyphenol. Các mô tả này phù hợp với quan sát thực nghiệm rằng điều kiện trung tâm cho TPC và DPPH cao và giá trị IC_{50} thấp, còn điểm trục, biên có xu hướng kém hơn.

Bảng 5. Các thông số chẩn đoán thống kê của phương trình hồi quy đối với các biến đáp ứng

	Phương trình	R^2	R^2_{adj}	R^2_{pre}	CV %	Adeq Precision
TPC	$Y_1 = 242{,}409 - 1{,}438X_1 - 0{,}093X_2 - 8{,}321X_3 + 2{,}783X_1X_2 - 0{,}701X_1X_3 - 3{,}131X_2X_3 - 15{,}626X_1^2 - 15{,}175X_2^2 - 22{,}408X_3^2$	0,9978	0,9957	0,9854	0,77	57,1967
DPPH	$Y_2 = 416{,}213 - 9{,}172X_1 - 8{,}183X_2 - 6{,}881X_3 + 0{,}838X_1X_2 - 2{,}996X_1X_3 - 17{,}683X_2X_3 - 23{,}508X_1^2 - 39{,}362X_2^2 - 49{,}939X_3^2$	0,9891	0,9793	0,9331	2,25	28,5949
α-glucosidase (IC_{50})	$Y_3 = 3{,}309 - 0{,}00008X_1 + 0{,}161X_2 + 0{,}540X_3 - 0{,}014X_1X_2 + 0{,}024X_1X_3 + 0{,}163X_2X_3 + 0{,}392X_1^2 + 0{,}548X_2^2 + 0{,}958X_3^2$	0,9995	0,9991	0,9971	0,67	142,9699

Ghi chú: TPC: Hàm lượng polyphenol tổng; R²adj: Hệ số xác định điều chỉnh; R²pre: Hệ số xác định dự đoán. Chênh lệch giữa R²pre và R²adj ở các mô hình đều < 0,2; cho thấy độ tương thích cao. Chỉ số Adeq Precision (tỷ lệ tín hiệu/nhiễu) đều lớn hơn 4, đảm bảo mô hình có đủ độ tin cậy để dự đoán

Bảng 6. Giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán của các biến phản hồi tại điều kiện chiết xuất tối ưu

Biến đáp ứng	Điều kiện chiết xuất tối ưu			Giá trị trung bình	
	Nồng độ Ethanol % (v/v)	Nhiệt độ chiết xuất (ºC)	Thời gian chiết xuất (phút)	Giá trị dự đoán	Giá trị thực nghiệm
TPC (mg GAE/g ck)	49,03	79,58	9,21	243,113 ± 1,617	240,113 ± 3,792
DPPH (mg TE/g ck)	49,03	79,58	9,21	416,824± 7,759	408,831± 8,425
α-glucosidase (IC_{50}, µg/mL)	49,03	79,58	9,21	3,247 ± 0,030	3,146 ± 0,387

Chú thích: Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) (n = 3). TPC: tổng hàm lượng polyphenol tổng. Giá trị hàm mong muốn (desirability) = 97,6 %

3.3. Tối ưu hóa đa mục tiêu và xác thực thực nghiệm

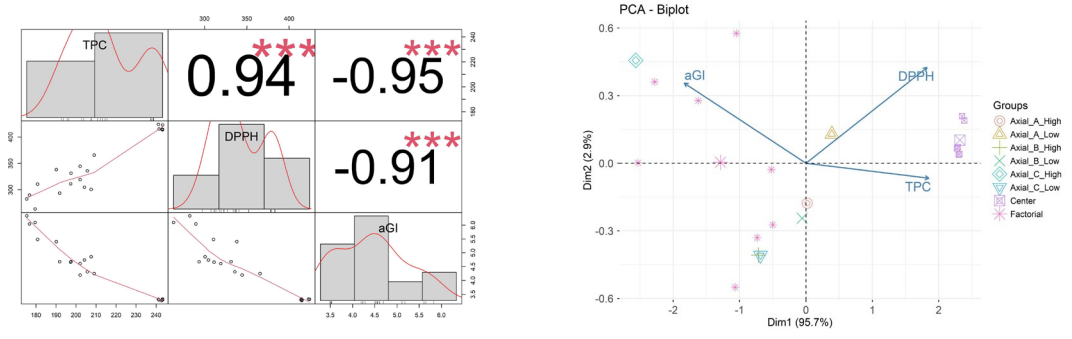
Tối ưu hóa đồng thời ba hàm mục tiêu (tối đa hóa TPC và DPPH, tối thiểu hóa IC_{50}) cho điều kiện PLE tối ưu: nồng độ ethanol 49,03%, nhiệt độ chiết 79,58°C và thời gian chiết 9,21 phút. Tại điều kiện này, giá trị hàm mục tiêu đạt được lần lượt là TPC 240,113 ± 3,792 mg GAE/g ck, DPPH 408,831 ± 8,425 mg TE/g ck và giá trị IC_{50} 3,146 ± 0,387 µg/mL, với giá trị hàm mong muốn (desirability) = 97,6%. Kết quả nghiên cứu cho thấy vùng tối ưu của quá trình chiết xuất lỏng áp suất cao (PLE) các hợp chất polyphenol từ lá ổi rừng đạt được tại nồng độ ethanol trung gian (49 ÷ 50%), nhiệt độ khoảng 80°C và thời gian chiết xuất trong khoảng 9 ÷ 10 phút. Xu hướng này phù hợp với nhiều nghiên cứu đã công bố về chiết xuất polyphenol bằng PLE và các kỹ thuật chiết xuất có tăng cường khác, trong đó dung môi ethanol - nước ở nồng độ trung gian thường mang lại hiệu quả thu hồi cao nhất do tạo được sự cân bằng về độ phân cực, khả năng thấm ướt ma trận thực vật và

độ hòa tan của phổ hợp chất polyphenol đa dạng (Pereira et al., 2019; Chemat et al., 2020). Khi nồng độ ethanol quá thấp, khả năng hòa tan các flavonoid và polyphenol ít phân cực bị hạn chế, trong khi nồng độ ethanol quá cao làm giảm tính hòa tan của các polyphenol ưa nước, dẫn đến sự suy giảm tổng hàm lượng polyphenol và hoạt tính sinh học.

Kết quả xác thực thực nghiệm với sai lệch nhỏ hơn 5% so với giá trị dự đoán khẳng định độ tin cậy của mô hình, tương tự như các nghiên cứu PLE tối ưu hóa polyphenol từ bã nho và lá trà xanh đã được công bố (Pereira et al., 2019; Le et al., 2024). Giá trị IC_{50} đạt 3,146 ± 0,387 µg/mL phản ánh chính xác hoạt tính cao của nguồn gen lá ổi rừng (*Psidium guajava* L.) thu hái tại Tây Nguyên. So với các công bố trước đây trên cùng nguồn nguyên liệu (Nguyen et al., 2022; Dang et al., 2024), ngưỡng ức chế này hoàn toàn tương thích và thể hiện sự vượt trội so với đối chứng dương acarbose (IC_{50} ~ 127 µg/mL). Sự gia tăng hoạt lực này là do sự phá vỡ triệt để cấu trúc vi mô của vách tế bào và tăng cường động lực truyền khối dưới điều kiện áp suất cao của hệ thống PLE (Mustafa & Turner, 2011; Chemat et al., 2020; Višnjevec et al., 2024); vì vậy, thúc đẩy sự giải phóng tối đa các hợp chất polyphenol. Dưới góc độ hóa sinh, các hợp chất polyphenol trong lá ổi đã được ghi nhận chứa mật độ nhóm hydroxyl cao, có ái lực liên kết trực tiếp với các gốc amino acid tại trung tâm hoạt động của α-glucosidase, tạo ra hiệu ứng ức chế hiệp đồng và đặc hiệu vượt trội (Wang et al., 2010; Kumar et al., 2021; Díaz-de-Cerio et al., 2023). Bên cạnh những giá trị sinh học nổi bật, kết quả tối ưu hóa còn minh chứng cho thấy PLE thể hiện tính ưu việt về hiệu suất công nghệ chiết xuất. Tại điều kiện tối ưu, TPC đạt 240,113 mg GAE/g (với thời gian chiết xuất 9,21 phút), trong khi phương pháp chiết xuất hỗ trợ siêu âm (UAE) thực hiện trên cùng đối tượng nguyên liệu, TPC đạt 152,954 mg GAE/g trong 10 phút) (Dang et al., 2024). Ngoài ra, việc vận hành trong hệ thống khép kín tự động không chỉ ngăn chặn hoàn toàn sự hao hụt dung môi do hóa hơi ở nhiệt độ cao, mà còn đảm bảo tính đồng nhất giữa các mẻ chiết. Những đặc tính này khắc phục triệt để điểm yếu của các kỹ thuật chiết hở truyền thống, tạo tiền đề vững chắc để nâng cấp quy mô (scale-up) lên mức độ công nghiệp, qua đó khẳng định tính đột phá của quy trình.

3.4. Phân tích tương quan và thành phần chính giữa tổng hàm lượng polyphenol (TPC) và hoạt tính sinh học

Ma trận tương quan Pearson cho thấy TPC tương quan dương mạnh với DPPH (r = 0,94; p < 0,0001), điều này cho thấy các hợp chất polyphenol lá ổi rừng đóng vai trò chủ đạo trong hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết. Đồng thời, TPC tương quan âm mạnh với IC_{50} của α-glucosidase (r = -0,95; p < 0,0001), cho thấy khi hàm lượng polyphenol tăng, hiệu lực ức chế α-glucosidase tăng (IC_{50} giảm) (Hình 5). Bên cạnh đó, hoạt tính trung hòa gốc tự do DPPH cũng thể hiện mối tương quan nghịch chặt chẽ với giá trị IC_{50} của α-glucosidase (r = -0,91; p < 0,0001). Mối tương quan này là minh chứng cho thấy các mẫu dịch chiết lá ổi rừng có hoạt tính chống oxy hóa càng cao thì khả năng ức chế enzyme phân giải carbohydrate càng mạnh. Xu hướng đồng biến về mặt hoạt tính sinh học này hoàn toàn thống nhất với kết quả nghiên cứu trước đây trên đối tượng lá ổi rừng được thu hái tại Tây Nguyên (Nguyen et al., 2022). Các điểm trên khẳng định vai trò kép của các hợp chất có tính khử trong việc vừa kiểm soát stress oxy hóa vừa hỗ trợ hạ đường huyết. Các kết quả nghiên cứu tương tự trên lá ổi và các nguồn thực vật giàu polyphenol khác khẳng định flavonoid và acid phenolic được xem là các tác nhân chính chịu trách nhiệm cho hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme tiêu hóa carbohydrate (Wang et al., 2010; Kumar et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Díaz-de-Cerio et al., 2023).



(a) **(b)**

Hình 5. Ma trận tương quan Pearson và phân tích thành phần chính (PCA) đánh giá mối liên hệ giữa các thông số chiết xuất đa dạng và hoạt tính sinh học thể hiện bởi chiết xuất lá ổi

Việc phân tích PCA bổ trợ cho Pearson khi cho thấy Dim1 giải thích 95,7 % và Dim2 giải thích 2,9 % biến thiên, tổng cộng 98,6 % phương sai dữ liệu. Trên không gian PCA, các biến TPC và DPPH cùng hướng (tương quan dương), trong khi giá trị IC_{50} nằm theo hướng đối nghịch (tương quan âm), qua đó trực quan hóa mối quan hệ giàu polyphenol dẫn đến chống oxy hóa cao và ức chế α-glucosidase mạnh. Đồng thời, việc các nghiệm thức tại điều kiện trung tâm tập trung gần vùng đáp ứng tối ưu cho thấy các điều kiện chiết xuất trung gian là phù hợp nhất để thu nhận đồng thời hàm lượng polyphenol cao với hoạt tính sinh học mạnh. Kết quả PCA trong nghiên cứu này đóng vai trò hỗ trợ diễn giải và củng cố ý nghĩa sinh học của kết quả RSM, tương tự cách tiếp cận đã được áp dụng trong các nghiên cứu tối ưu hóa chiết xuất polyphenol và hoạt tính sinh học khác (Dang et al., 2024; Le et al., 2024).

Các kết quả mô hình hóa, tối ưu hóa và xác thực cho thấy PLE kết hợp RSM - CCD là hướng tiếp cận hiệu quả để tạo dịch chiết lá ổi rừng giàu polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế α-glucosidase *in vitro*.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tối ưu hóa hiệu quả quá trình chiết xuất các hợp chất polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa và ức chế α-glucosidase từ lá ổi rừng (*Psidium guajava* L.) bằng phương pháp chiết xuất lỏng áp suất cao (PLE) kết hợp với phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Mô hình hồi quy bậc hai được xây dựng từ thiết kế tâm xoay (CCD) cho độ tin cậy cao, cho phép dự đoán đồng thời hàm lượng polyphenol tổng, hoạt tính chống oxy hóa và khả năng ức chế α-glucosidase của chiết xuất. Điều kiện chiết xuất tối ưu được xác định là nồng độ ethanol 49,03%, nhiệt độ 79,58°C và thời gian 9,21 phút, tại đó chiết xuất thu được hàm lượng polyphenol cao cùng hoạt tính sinh học mạnh; các phân tích tương quan Pearson và phân tích thành phần chính (PCA) cho thấy polyphenol là nhóm hợp chất chính quyết định các hoạt tính này. Các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào mở rộng quy mô quy trình PLE ở mức pilot, đánh giá tính ổn định của chiết xuất theo mùa vụ và vùng sinh thái, cũng như xác định cụ thể các hợp chất polyphenol và phenolic acid chính bằng các kỹ thuật phân tích hiện đại (LC-MS) nhằm làm rõ mối liên hệ giữa thành phần hóa học và hiệu quả sinh học, từ đó hỗ trợ quá trình chuyển giao và ứng dụng trong thực tế.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này được hỗ trợ về trang thiết bị từ Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên dành cho nghiên cứu sinh. Đặng Thị Ngọc Dung để thực hiện các thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chemat, F., Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Binello, A., & Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, *22*(8), 2325–2353. https://doi.org/10.1039/C9GC03878G

Dang, N.-D. T., Nguyen, M.-T., Bui Thi, B.-H., Mai, Q.-Q., Nguyen, P.-V., & Nguyen, Q.-V. (2024). Optimizing Polyphenolic Extraction from Wild Guava Leaves: A Response Surface Methodology Approach to Antioxidant and α-Glucosidase Inhibitory Activities. *Natural Product Communications*, *19*(12), 1934578X241308480. https://doi.org/10.1177/1934578X241308480

Díaz-de-Cerio, E., Girón, F., Pérez-Garrido, A., Pereira, A. S. P., Gabaldón-Hernández, J. A., Verardo, V., Segura Carretero, A., & Pérez-Sánchez, H. (2023). Fishing the Targets of Bioactive Compounds from Psidium guajava L. Leaves in the Context of Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5761. https://doi.org/10.3390/ijms24065761

Hirondart, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A. S., Bily, A., & Chemat, F. (2020). Comparison between Pressurized Liquid Extraction and Conventional Soxhlet Extraction for Rosemary Antioxidants, Yield, Composition, and Environmental Footprint. *Foods*, *9*(5), 584. https://doi.org/10.3390/foods9050584

Koraqi, H., Petkoska, A. T., Khalid, W., Sehrish, A., Ambreen, S., & Lorenzo, J. M. (2023). Optimization of the Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Strawberry Fruits (Fragaria x ananassa Duch.) Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, *16*(6), 1030–1042. https://doi.org/10.1007/s12161-023-02469-6

Kumar, M., Tomar, M., Amarowicz, R., Saurabh, V., Nair, M. S., Maheshwari, C., Sasi, M., Prajapati, U., Hasan, M., Singh, S., Changan, S., Prajapat, R. K., Berwal, M. K., & Satankar, V. (2021). Guava (Psidium guajava L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. *Foods*, *10*(4), 752. https://doi.org/10.3390/foods10040752

Le, T. M., Nguyen, C. D. P., & Ha, A. C. (2024). Optimisation and Evaluation of the Correlation

of Extraction Conditions for Total Flavonoid Content and Antixanthine Oxidase Activity in Psidium guajava. *Journal of Herbal Medicine*, *47*, 100915. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2024.100915

Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. J Chromatogr A 1635:461770.

Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (Ninth). (Original work published John Wiley & Sons, Inc)

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, *703*(1), 8–18. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018

Nguyen, Q. V., Doan, M.-D., Bui Thi, B.-H., Nguyen, M.-T., Tran Minh, D., Nguyen, A.-D., Le, T.-M., Nguyen, T.-H., Nguyen, T.-D., Tran, V.-C., & Hoang, V.-C. (2023). The effect of drying methods on chlorophyll, polyphenol, flavonoids, phenolic compounds contents, color and sensory properties, and *in vitro* antioxidant and anti-diabetic activities of dried wild guava leaves. *Drying Technology*, *41*(8), 1291–1302. https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2145305

Nguyen, Q. V., Huyen, B., Thi, B., Tran, M.-Đ., Nguyen, M.-T., Doan, M.-D., Nguyen, A.-D., Minh Le, T., Tran, V.-C., & Pham, T.-N. (2022). Impact of Different Drying Temperatures on *In Vitro* Antioxidant and Antidiabetic Activities and Phenolic Compounds of Wild Guava Leaves Collected in the Central Highland of Vietnam. *Natural Product Communications*, *17*(4), 1934578X2210953. https://doi.org/10.1177/1934578X221095349

Nguyen, V. B., Nguyen, Q. V., Nguyen, A. D., & Wang, S.-L. (2017). Screening and evaluation of α-glucosidase inhibitors from indigenous medicinal plants in Dak Lak Province, Vietnam. *Research on Chemical Intermediates*, *43*(6), 3599–3612. https://doi.org/10.1007/s11164-016-2434-x

Pereira, D. T. V., Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2019). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of Food Engineering*, *240*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019

Rocha, G. J. R., Aguiar, A. C., Abud, C. O. G., Pertuzatti, P. B., Sampaio, K. A., & Paula, J. T. (2025). Pressurized liquid extraction as a green technique for bioactive compounds recovery from Momordica charantia leaves. *Applied Food Research*, *5*(1), 100795. https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.100795

Santos, D. T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. A. (2012). Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, *108*(3), 444–452. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022

Sarker, S. D., & Nahar, L. (2024). Response surface methodology (RSM) in phytochemical research. In *Computational Phytochemistry* (pp. 59–90). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16102-5.00007-9

Višnjevec, A. M., Barp, L., Lucci, P., & Moret, S. (2024). Pressurized liquid extraction for the determination of bioactive compounds in plants with emphasis on phenolics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *173*, 117620. https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117620

Wang, H., Du, Y.-J., & Song, H.-C. (2010). α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, *123*(1), 6–13. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.088