



ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH TRÍCH LY CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ CÂY THUỐC DÒI (*POUZOLZIA ZEYLANICA* L. BENN)

Trần Thị Thùy Linh¹ và Nguyễn Minh Thủy²

¹ Học viên Cao học CNSTH K19, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Factors affecting to the extraction of bioactive compounds in *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn

Từ khóa:

Hoạt chất sinh học, nhiệt độ, thời gian, pH, cây thuốc dòi

Keywords:

Bioactive compounds, temperature, time, pH, "thuoc gioi" plant

ABSTRACT

Refreshment drink is traditionally called for cooked juice from natural herbs containing pharmaceutics, being extracted from different plants which are useful for cleanse the body. "Thuoc doi" (or called "Bo mam") (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn) is a typical type is known.

The study was carried out to optimize the extraction of compounds with high biological activity (anthocyanins, tannins, total polyphenols and total soluble solid content) from medicinal plants. The process was investigated in the temperatures ranging of 70 to 90°C during 10 to 30 minutes and controlled pH (3 to 6). The results showed that the good conditions for extracting bioactives from "thuoc doi" plant is 90°C and 20 minutes of boiling. The pH of extraction about 4 in combination with the stirring process recovered the highest content of bioactive compounds from "thuoc doi" plant.

TÓM TẮT

Nước mát là tên gọi dân gian của các loại nước nấu từ các loại cây tự nhiên có chứa dược liệu giúp thanh nhiệt cơ thể. Cây thuốc dòi (hay còn gọi là "Bọ mắ m") (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn) là một loại điển hình được biết đến với tính mát và nhiều tác dụng tốt. Nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu hóa quá trình trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học cao (hàm lượng anthocyanin, tannin, polyphenol tổng số và tổng chất khô hòa tan) từ cây thuốc dòi. Các thông số khảo sát trong quá trình trích ly bao gồm nhiệt độ (70÷90°C), thời gian (10÷30 phút) và pH (3÷6). Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ tốt cho quá trình trích ly các hoạt chất sinh học từ cây thuốc dòi (dạng cắt khúc) là 90°C trong thời gian 20 phút. pH dịch trích khoảng 4 kết hợp với quá trình khuấy trộn cho hiệu suất thu hồi các hoạt chất sinh học từ nguyên liệu là cao nhất.

1 GIỚI THIỆU

Thuốc dòi hay còn gọi là Bọ mắ m có tên khoa học là *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn thuộc họ Gai (Urticaceae). Cây có tính ngọt, đắng nhạt, tính mát, có tác dụng tiêu khát, trừ đờm, lợi tiểu, tiêu viêm (Tô Đăng Hải, 2003). Trong cây thuốc dòi có sự

hiện diện của alkaloid, glycosides, tannin và flavonoid đã được khẳng định trong quá trình sàng lọc sơ bộ phytochemical (Swati *et al.*, 2012), đây là những hợp chất chống oxy hóa cao.

Mặc dù, cây thuốc dòi được biết và sử dụng khá rộng rãi trong dân gian nhưng vẫn chưa có nhiều

nguyên cứu về thành phần hóa học cũng như ứng dụng trong chế biến thực phẩm được báo cáo.

Nước mát được nấu từ các loại thực vật chứa dược liệu có tác dụng thanh nhiệt (làm cho cơ thể mát và hạ sốt) thường được sử dụng trong gia đình vào mùa nắng nóng. Sự tiện dụng sẽ đạt được bằng những sản phẩm sẵn có hàm lượng các hoạt chất sinh học cao. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu nhằm trang bị các kiến thức khoa học trong việc trích ly hiệu quả các hợp chất sinh học quý từ cây thuốc dòi và làm cơ sở cho việc ứng dụng vào chế biến nước giải khát từ loại nguyên liệu có đặc tính sinh học cao, giá thành rẻ và khá phổ biến này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

2.1.1 Nguyên vật liệu

Thuốc dòi màu tím (Hình 1) được chọn cho nghiên cứu, được mua ở chợ Xuân Khánh- Cần Thơ, loại bỏ những lá bị dập, vàng úa và được rửa sạch.



Hình 1: Cây thuốc dòi tím

2.1.2 Thiết bị và dụng cụ

Máy đo quang phổ UV-Vis, máy đo pH, thiết bị khuấy (tốc độ 29 vòng/phút).

2.1.3 Hóa chất

KMnO₄ (Trung Quốc), Indigocarmine (Trung Quốc), dung dịch H₂SO₄ (Trung Quốc), dung dịch đệm pH 1, pH 4,5, Folin-Ciocalteu (Đức), dung dịch HCl (Trung Quốc), acid oxalic (Trung Quốc), than hoạt tính, acid gallic (Đức), Na₂CO₃.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thuốc dòi được rửa sạch để ráo nước, chuyển vào nồi nấu, tiến hành trích ly ở các điều kiện: tỷ lệ

nguyên liệu/ nước 1/5, 1/10, 1/15 và 1/20 (w/w), biện pháp xử lý nguyên liệu (nguyên cây, cắt khúc - thuốc dòi nguyên cây có chiều dài khoảng 25-30 cm và cắt khúc chiều dài khoảng 2-3 cm), phương pháp xử lý (khuấy trộn với tốc độ cánh khuấy 29 vòng/phút hoặc không khuấy trộn), pH (3, 4, 5 và 6), nhiệt độ dung môi trích ly (70, 80 và 90°C) theo thời gian. Dịch trích sau xử lý được lọc và phân tích các hoạt chất sinh học (tannin, anthocyanin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan).

2.3 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu và xử lý dữ liệu thu thập

Tannin được phân tích theo phương pháp so màu Neubauer-Lowenthal, trong đó sử dụng potassium permanganate như là tác nhân oxy hóa và indigo sulfate là chất chỉ thị được đề xuất bởi Lowenthal (1877).

Hàm lượng anthocyanin được phân tích theo phương pháp pH vi sai (AOAC International, 2003) dựa trên sự thay đổi màu theo cấu trúc của anthocyanin giữa pH 1,0 và 4,5.

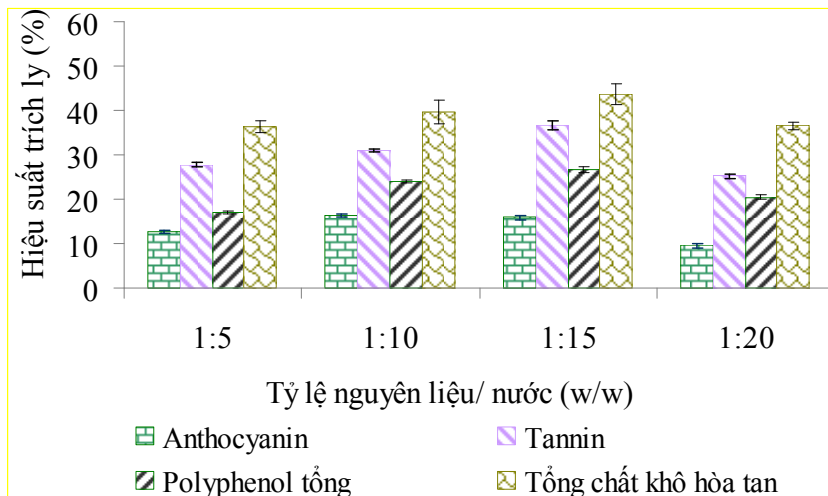
Hàm lượng polyphenol tổng số được phân tích theo phương pháp của Singleton et al., (1999) với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Đường cong chuẩn của acid gallic được xây dựng và hàm lượng tổng polyphenol được xác định dựa vào đường cong chuẩn.

Số liệu thu thập được tính toán thống kê bằng phần mềm STATGRAPHIC Centurion XVI và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/ nước đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hiệu suất trích ly các hoạt chất được thể hiện ở Hình 2. Kết quả cho thấy hiệu suất trích ly anthocyanin cao nhất ở tỷ lệ 1/10 đạt 16,28% cao hơn tỷ lệ 1/15 là 0,42%, sự chênh lệch này là không đáng kể. Ngoài ra, hiệu suất trích ly của tannin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan đạt cao nhất trong ứng 36,68, 26,73 và 43% ở tỷ lệ 1/15. Nếu lượng dung môi ít dẫn đến trích ly không hoàn toàn, trong khi lượng dung môi lớn hơn có thể gây ra lãng phí.



Hình 2: Ảnh hưởng tỷ lệ nguyên liệu/nước đến hiệu suất trích ly các hợp chất sinh học

Quá trình hòa tan các hoạt chất sinh học vào dung môi là quá trình vật lý. Khi lượng dung môi tăng, tạo cơ hội các hoạt chất sinh học tiếp xúc với dung môi dẫn đến khả năng thẩm thấu cao hơn. Khi tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu lớn, nghĩa là sự khác biệt về nồng độ giữa dung môi và các chất hòa tan trở nên lớn. Vì vậy, nhiều hoạt chất sinh học có thể hòa tan nếu lượng nước được sử dụng nhiều hơn (Cacace & Mazza, 2003).

3.2 Ảnh hưởng biện pháp xử lý nguyên liệu đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Kích thước nguyên liệu ảnh hưởng đến khả năng

Bảng 1: Ảnh hưởng biện pháp xử lý đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Biện pháp xử lý nguyên liệu	Hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học (%)			
	Anthocyanin	Tannin	Polyphenol tổng	Tổng chất khô hòa tan
Nguyên cây	12,63 ^a	28,04 ^a	20,85 ^a	37,56 ^a
Cắt khúc	14,54 ^b	32,32 ^b	23,29 ^b	40,50 ^b

Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức với các chữ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa 5%

3.3 Ảnh hưởng phương pháp xử lý đến hiệu suất trích ly

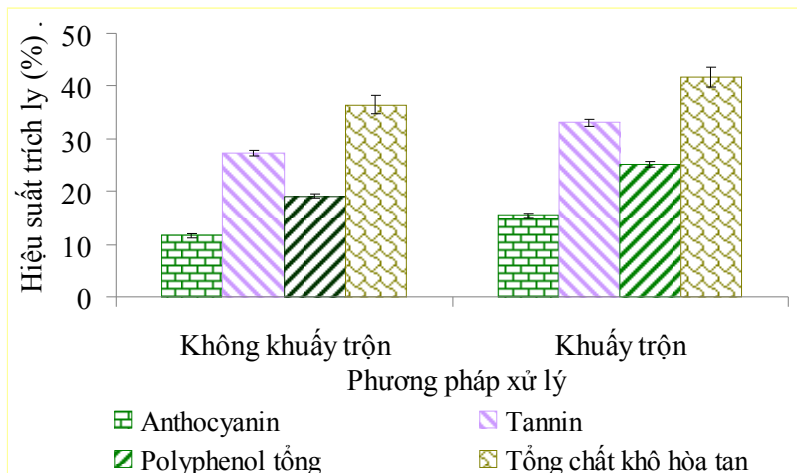
Ảnh hưởng phương pháp khuấy trộn đến hiệu suất trích ly các hợp chất sinh học được thể hiện ở Hình 3. Quá trình trích ly có sử dụng khuấy trộn cho hiệu suất cao hơn không sử dụng khuấy trộn. Điều này phù hợp với lý thuyết truyền khối.

Trong quá trình trích ly các hợp chất sinh học từ cây thuốc dồi với biện pháp khuấy trộn, hiệu suất thu được của anthocyanin, tannin, polyphenol

năng trích ly và diện tích truyền khối trên đơn vị thể tích tăng khi kích thước nguyên liệu giảm. Tuy nhiên, nếu kích thước nguyên liệu quá nhỏ sẽ gây khó khăn trong việc phân riêng pha lỏng và rắn khi kết thúc quá trình trích ly.

Kết quả thể hiện ở Bảng 1 cho thấy nguyên liệu được cắt khúc đạt hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học cao hơn để nguyên cây. Khi nguyên liệu cắt nhỏ sẽ làm tăng diện tích tiếp xúc bề mặt giữa nguyên liệu và dung môi, khi đó quá trình khuếch tán các chất trong nguyên liệu ra dung môi sẽ tăng.

tổng và tổng chất khô hòa tan tương ứng là 15,46 - 33,08 - 25,05 và 41,66%, cao hơn so với không khuấy trộn (tương ứng là 3,77 - 5,8 - 5,96 và 5,26%). Theo Mohamad *et al.* (2010), trong quá trình trích ly lỏng- rắn, chất tan di chuyển từ bên trong ra bên ngoài thông qua quá trình khuếch tán hoặc mao dẫn, khi dung dịch bị khuấy động dẫn đến hệ số truyền khối tăng, sẽ làm giảm kích thước lớp biên bao bọc xung quanh nguyên liệu, tạo hiệu quả cho quá trình trích ly.

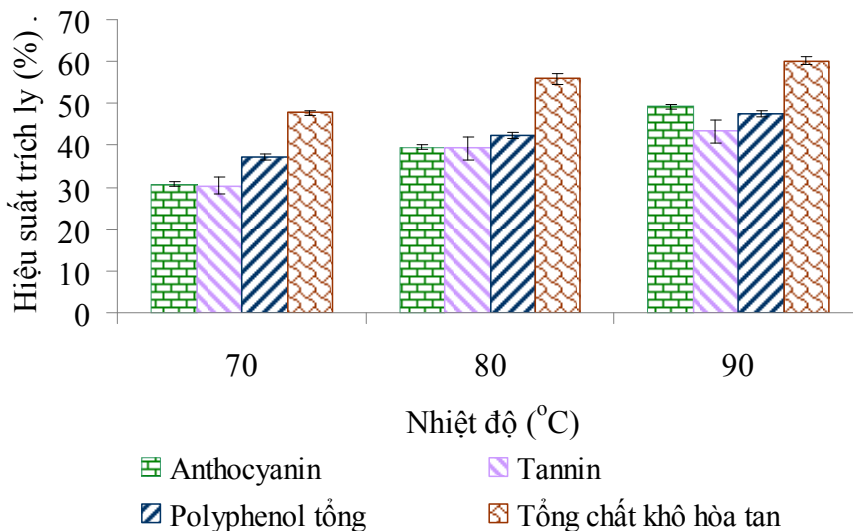


Hình 3: Ảnh hưởng phương pháp xử lý khuấy trộn đến hiệu suất trích ly

3.4 Ảnh hưởng nhiệt độ đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Trạng thái cân bằng (hòa tan) và tốc độ truyền khối (hệ số khuếch tán) có thể ảnh hưởng bởi nhiệt độ trích ly. Theo lý thuyết, sự thâm và hòa tan của dung môi tăng khi nhiệt độ tăng, vì thế làm tăng hiệu quả và tốc độ trích ly. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Hình 4. Hàm lượng các hoạt chất

trích ly từ thuốc dồi tăng khi nhiệt độ dung môi tăng từ 70 đến 90°C và đạt hiệu suất trích ly cao nhất ở 90°C đối với anthocyanin, tannin, polyphenol và tổng chất khô hòa tan tương ứng là 49,19 - 43,34 - 47,57 và 60,11%, kết quả tương tự về ảnh hưởng nhiệt độ cho trích ly polyphenol từ chè xanh vụn của Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư (2009).



Hình 4: Ảnh hưởng nhiệt độ đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Xử lý nhiệt làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của các hợp chất; giảm độ nhớt dung môi, tăng khả năng truyền khối và xâm nhập của dung môi vào trong tế bào (Al-Farsi & Lee, 2008). Mặt khác, theo Mohamad *et al.* (2010), nhiệt độ

cao có thể làm giảm các rào cản tế bào do suy yếu thành và màng tế bào, kết quả làm dung môi dễ dàng tiếp xúc với các hoạt chất, làm tăng khả năng trích ly.

3.5 Ảnh hưởng pH đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Thuốc dòi được trích ly với pH từ 3 đến 6. Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng các hoạt chất trích ly tăng khi pH tăng từ 3 đến 4 nhưng giảm khi pH cao hơn 4, kết quả phù hợp với

kết quả nghiên cứu của một Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư (2009) trong trích ly polyphenol từ chè xanh vụn và Ruenroengklin *et al.* (2008) với nghiên cứu trích ly anthocyanin từ vỏ trái vải. Riêng tổng chất khô hòa tan, hàm lượng thu được cao nhất ở pH 3.

Bảng 2: Ảnh hưởng pH đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

pH	Hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học (%)			
	Anthocyanin	Tannin	Polyphenol tổng	Tổng chất khô hòa tan
3	59,00 ^c	37,73 ^b	44,10 ^c	70,96 ^c
4	65,90 ^d	42,56 ^c	45,51 ^c	63,40 ^b
5	20,65 ^b	35,24 ^a	41,07 ^b	43,39 ^a
6	16,33 ^a	35,76 ^a	39,75 ^a	41,61 ^a

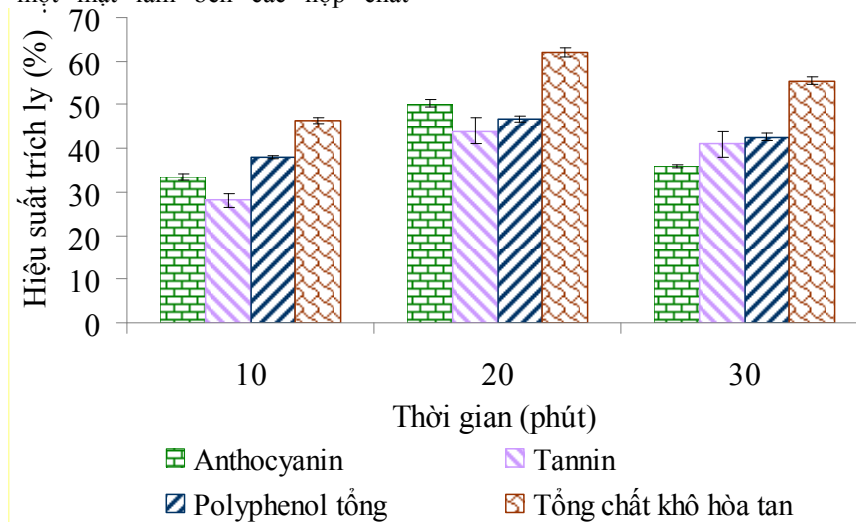
Ghi chú: Các trung bình nghiệm thức với các chữ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa 5%

Các polyphenol là những chất chống oxy hóa mạnh nên dễ oxy hóa ở pH cao (Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư, 2009), ở pH thấp có thể ức chế quá trình oxy hóa các hợp chất polyphenol và hàm lượng thu được cao hơn. Anthocyanin, tannin và polyphenol tổng thuộc nhóm phenol, có chứa các nhóm chức polyphenol phân cực tan tốt trong dung môi phân cực và nước là dung môi phân cực, khi bổ sung acid vào nước làm tăng tính phân cực nên ở giá trị pH thấp cho hàm lượng cao hơn. Ngoài ra, pH thấp một mặt làm bền các hợp chất

anthocyanin, mặt khác kìm hãm sự hoạt động của enzyme polyphenol oxidase (Ruenroengklin *et al.*, 2008).

3.6 Ảnh hưởng thời gian đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Xác định thời gian của quá trình trích ly cần thiết để lấy hầu hết các hợp chất sinh học mong muốn, thường đây sẽ là thời điểm cân bằng giữa bên trong và bên ngoài tế bào được thiết lập.



Hình 5: Ảnh hưởng thời gian đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học

Thời gian ảnh hưởng đến khả năng trích ly các hoạt chất. Nếu thời gian trích ly ngắn, lượng các hoạt chất sinh học không trích ly hoàn toàn, nhưng nếu thời gian quá dài các hoạt chất sẽ bị oxy hóa, chất lượng và số lượng các hoạt chất sẽ giảm. Kết

quả thể hiện ở Hình 5 cho thấy hiệu suất trích ly tăng từ 10 đến 20 phút và giảm từ 20 đến 30 phút. Bởi vì hầu hết các hoạt chất sinh học rất nhạy cảm với nhiệt độ cao, giữ trong thời gian dài sẽ dẫn đến sự phân hủy các hoạt chất sinh học tương tự như báo cáo của Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư (2009).

3.7 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng (nhiệt độ, thời gian, pH) đến hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học từ cây thuốc đời

Tối ưu hóa hiệu suất trích ly các hoạt chất sinh học được thực hiện theo phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology). Trong tối ưu hóa quá trình trích ly, ba biến độc lập là thời gian trích ly (X: 10-30 phút), nhiệt độ (Y: 70-90°C) và pH (Z: 3-6) ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly anthocyanin (A), tannin (T), polyphenol tổng (TP) và tổng chất khô hòa tan (TSS) được lựa chọn.

Từ phân tích dữ liệu thực nghiệm, phương trình hồi quy được xây dựng ảnh hưởng nhiệt độ, thời gian, pH đến hiệu suất trích ly anthocyanin, tannin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan được thể hiện qua các phương trình (1), (2), (3) và (4) với hệ số tương quan $R^2 \geq 0,81$.

$$A (\%) = -58,493 + 6,399 X + 20,931 Z - 0,157 X^2 + 0,0122 Y^2 - 2,174 Z^2 - 0,231 YZ \quad (1) \quad (R^2 = 0,81)$$

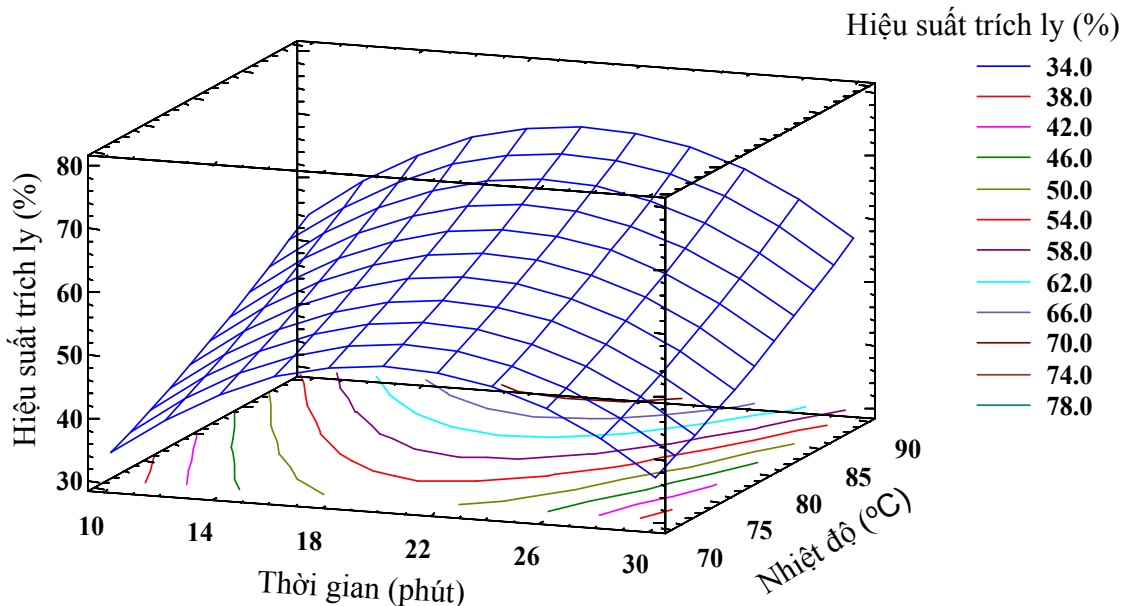
$$T (\%) = -214,123 + 5,358 X + 4,4409 Y - 0,0945 X^2 - 0,02426 Y^2 - 0,7778 Z^2 + 0,0716 ZY - 0,0117 XY \quad (2) \quad (R^2 = 0,85)$$

$$TP (\%) = -15,887 + 2,945 X + 0,362 Y - 0,064 X^2 - 0,422 Z^2 + 0,0342 YZ - 0,0318 XZ \quad (3) \quad (R^2 = 0,89)$$

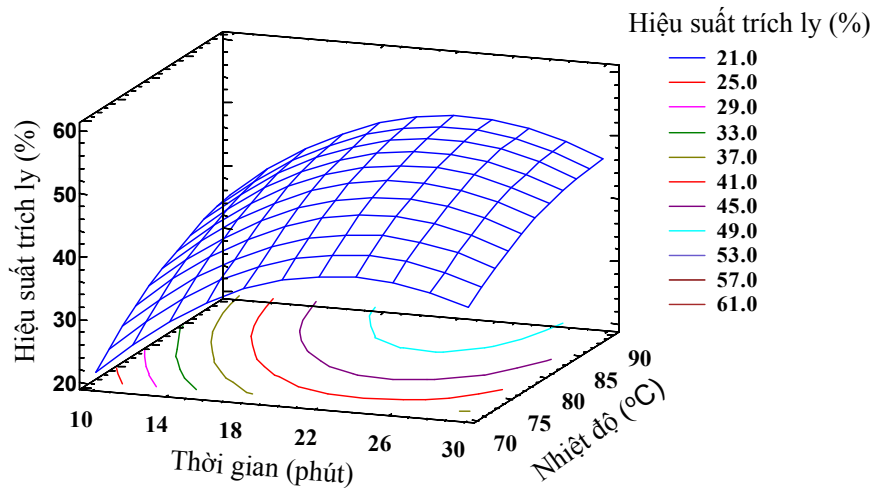
$$TSS (\%) = -68,321 + 4,094 X + 3,748 Y - 29,519 Z - 0,1113 X^2 - 0,0196 Y^2 + 1,687 Z^2 + 0,1806 XZ \quad (4) \quad (R^2 = 0,91)$$

So sánh hiệu suất trích ly các hoạt chất thực tế với lý thuyết cho thấy rằng 2 bộ số liệu (hiệu suất thực tế và lý thuyết) được phân phối hợp lý gần với đường thẳng (kết quả không trình bày đầy đủ ở đây), chỉ ra mối quan hệ giữa các giá trị lý thuyết và thực nghiệm là phù hợp. Hệ số xác định tương quan giữa hiệu suất trích ly lý thuyết và thực tế đối với anthocyanin, tannin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan tương ứng là 0,96, 0,97, 0,97 và 0,98 cho thấy có thể sử dụng mô hình dự đoán các kết quả trong quá trình trích ly.

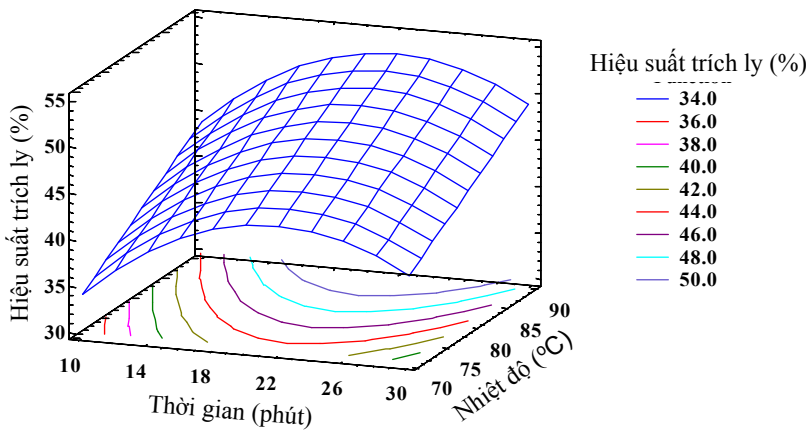
Các mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hiệu suất trích ly anthocyanin, tannin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan được trình bày ở Hình 6, 7, 8, 9.



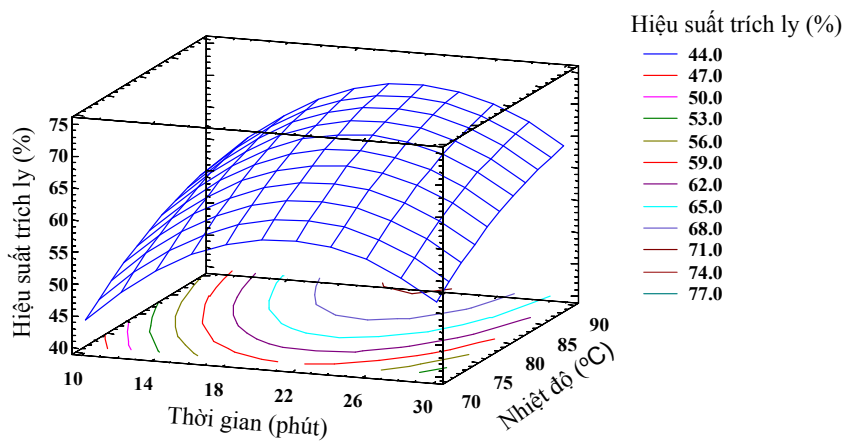
Hình 6: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa hiệu suất trích ly anthocyanin và nhiệt độ, thời gian (pH 4)



Hình 7: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa hiệu suất trích ly tannin và nhiệt độ, thời gian (pH 4)



Hình 8: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa hiệu suất trích ly polyphenol tổng và nhiệt độ, thời gian (pH 4)



Hình 9: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa hiệu suất trích ly tổng chất khô hòa tan và nhiệt độ, thời gian (pH 4)

Từ các mô hình bề mặt đáp ứng được biểu thị, ở pH 4 và 90°C, hiệu suất trích ly anthocyanin, tannin, polyphenol tổng và tổng chất khô hòa tan cao nhất với các cặp giá trị (Hiệu suất - Thời gian) tương ứng là (71,4% - 20,54 phút), (51,1% - 24,6 phút), (53,2% - 22 phút) và (71,4% - 20,7 phút).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng các yếu tố tác động như biện pháp xử lý nguyên liệu, phương pháp khuấy trộn, tỷ lệ nguyên liệu/ nước, thời gian, nhiệt độ và pH trích ly đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly các hợp chất có giá trị sinh học từ cây thuốc dòi. Trong các yếu tố trên, pH và phương pháp xử lý khuấy trộn ảnh hưởng quan trọng đến hiệu suất trích ly. Hiệu suất thu hồi các hoạt chất sinh học cao khi thực hiện trích ly ở tỷ lệ nguyên liệu và nước là 1/15, thực hiện khuấy trộn và cắt khúc nguyên liệu. Ngoài ra, khả năng trích ly các hoạt chất thu được cao nhất khi kết hợp ở nhiệt độ 90°C, pH 4 và trong khoảng thời gian 20-24 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Farsi, M.A. and Lee, C.Y., 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108: 977-985.
2. AOAC INTERNATIONAL, 2003. AOAC Official Methods Program Manual, www.aoac.org/vmeth/omamanual/omamanual.htm
3. Cacace, J.E. and Mazza, G., 2003. Mass Transfer Process during Extraction of Phenolic Compounds from Milled Berries. *Food and Eng.* 59: 379 – 389.
4. Lowenthal, J., 1877. *Über die Bestimmung des Gerbstoffs.*, *Z. Anal. Chem.*, 1877, volume 16, pages 33-48.
5. Mohamad, M., Ali M.W. and Ahmad, A., 2010. Modelling for extraction of major phytochemical components from *Eurycoma longifolia*. *Journal of Applied Sciences*, 10:2572-2577.
6. Ruenroengklin, N., Zhong J., Duan, X.W., Yang, B., Li, J.R. and Jiang, Y.M., 2008. Effects of various Temperatures and pH Values on the Extraction Yield of Phenolics from Litchi Fruit Pericarp Tissue and the Antioxidant Activity of the Extracted Anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, p. 1333-1341.
7. Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299:152-178.
8. Swati, P. and S. Dibyajyoti. 2012. Pharmacognostic Studies of Aerial Part of *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. *Asian J. Pharm. Tech.* Vol. 2: Issue 4, Pg 141-142.
9. Tô Đăng Hải. 2003. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam* (tập 1). NXB Khoa học và Kỹ thuật.
10. Vũ Hồng Sơn và Hà Duyên Tư. 2009. Nghiên cứu trích ly polyphenol từ chè xanh vụn- Phần 1: Các yếu tố ảnh hưởng quá trình trích ly polyphenol. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tập 47, số 1, trang 81-86.