

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT FLAVONOID TỪ CHÈ DÂY CAO BẰNG

Luu Hồng Sơn*, Phạm Thị Vinh, Đinh Thị Kim Hoa,
Phạm Thị Phương, Nguyễn Văn Duy, Trần Văn Chí, Tạ Thị Lượng
Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố nồng độ dung môi ethanol, thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi chiết, ảnh hưởng tới quá trình tách chiết flavonoid từ chè dây cho kết quả tương ứng: 70%; 90 phút; 80°C; 1/15 (w/v). Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện chiết tách, chúng tôi nhận thấy nồng độ dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm Box-Behnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết chè dây sử dụng ethanol 69,72%, thời gian tách chiết 92,75 phút, nhiệt độ tách chiết 79,88°C, hàm lượng flavonoid là 17,53%. Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.

Từ khóa: Cao Bằng, chè dây, flavonoid, tách chiết, tối ưu

MỞ ĐẦU

Chè dây là loại thảo dược quý trong điều trị các vấn đề về tiêu hóa đã được nêu trong cuốn “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam” của Đỗ Tất Lợi (2004) [4]. Các nghiên cứu đã xác định thành phần hóa học chính trong cây chè dây flavonoid, tanin, đường, caroten, sterol và axit hữu cơ [1]. Trong đó nhóm flavonoid rất được quan tâm nghiên cứu. Flavonoid từ chè dây có tác dụng chống viêm, giảm đau, giảm axit dịch vị, làm liền vết loét và có tác dụng diệt xoắn khuẩn *Helicobacter pylori* gây ra bệnh viêm loét dạ dày, hành tá tràng [5].

Việc tách chiết flavonoid chịu ảnh hưởng nhiều bởi dung môi, điều kiện chiết, và điều kiện địa lý. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là nhằm tối ưu hóa quá trình tách chiết flavonoid tổng số từ chè dây Cao Bằng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Chè dây tươi (*Ampelopsis cantoniensis*) được thu mua tại xã Yên Sơn, huyện Thông Nông, tỉnh Cao Bằng.

Nguyên liệu được rửa sạch, sau đó đem đi sấy ở nhiệt độ 60°C đến độ ẩm dưới 10%. Tiến hành bảo quản trong túi PE đặt trong hộp

nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng và ẩm.

Dung môi: Dung môi ethanol của Merck – Đức (dạng tinh khiết)

Bố trí thí nghiệm

Flavonoid được chiết từ cây chè dây bằng dung môi ethanol 60; 70; 80%. Nhiệt độ chiết là 70, 80, 90°C trong các khoảng thời gian 60, 90, 120 phút với tỷ lệ dung môi: Nguyên liệu lần lượt là 10: 1; 15:1; 20:1 (v/w). Sau khi tiến hành khảo sát các đơn nhân tố, chúng tôi lựa chọn 03 yếu tố là các yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng flavonoid tổng số trong cao chè dây, để đánh giá khả năng ảnh hưởng của chúng, chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box - Behnken với ba yếu tố, ba cấp độ.

Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng flavonoid tổng số bằng phương pháp cân

Cân chính xác 2g bột chè dây chiết trong bình Soxhlet bằng este dầu hỏa để loại chlorophyl (trong 2 giờ). Sau đó lấy túi chứa chè dây ra để ở nhiệt độ phòng cho bay hết dung môi rồi chiết kiệt flavonoid bằng ethanol 70%, cất thu hồi ethanol, còn dịch chiết nước, để nguội loại bỏ tanin bằng thuốc da hoặc gelatin 3% cho tới khi không còn xuất hiện kết tủa. Chiết lấy kiệt flavonoid bằng ethylacetat, bốc hơi

* Tel: 0973 919486, Email: Luuson.vp@gmail.com

dung môi rồi sấy cạn tới khối lượng không đổi, đem cân.

Hàm lượng flavonoid tổng số trong mẫu thử được tính theo công thức [3].

$$X (\%) = \frac{b}{a} \times 100\%$$

Trong đó:

X: % khối lượng flavonoid tổng số

b: Là khối lượng cặn thu được (g)

a: Là khối lượng mẫu đem phân tích khô tuyệt đối (g)

Phương pháp xác định độ ẩm nguyên liệu đến khối lượng không đổi

Nguyên tắc: Sấy mẫu đến khối lượng không đổi ở 105°C. Dưới tác dụng của nhiệt độ sấy làm bay hơi ẩm tự do và liên kết có trong mẫu. Độ ẩm của mẫu được tính dựa vào khối lượng giảm đi của mẫu trong quá trình sấy [4].

Công thức tính:

$$W (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

Trong đó:

W: Độ ẩm (%)

m₁: Khối lượng mẫu và chén sứ trước khi sấy (g)

m₂: Khối lượng mẫu và chén sứ sau khi sấy (g)

m₀: Khối lượng của chén sứ (g)

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 18.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol

Kết quả bảng 1 cho thấy chiết ở nồng độ ethanol khác nhau sẽ được hàm lượng flavonoid khác nhau và hàm lượng tăng lên khi chiết ở nồng độ ethanol từ 60% đến 70%. Flavonoid cao nhất tại nồng độ ethanol 70% tương ứng hàm lượng flavonoid 15,55%, tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 80% thì hàm lượng flavonoid lại giảm. Phùng Thị Vinh (1995) [5], khi nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chè dây

Ampelopsis cantonensis Plnach nhận thấy, nồng độ ethanol 70% cho hàm lượng flavonoid cao nhất. Vì vậy nồng độ ethanol thích hợp để thực hiện quá trình chiết flavonoid trong chè dây là 70%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng flavonoid tổng số

Công thức	Nồng độ ethanol (%)	Hàm lượng flavonoid tổng số (%)
CT1	60	14,93 ^c ± 0,061
CT2	70	15,55 ^a ± 0,035
CT3	80	15,15 ^b ± 0,035

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha < 0,05$

Ảnh hưởng của thời gian chiết

Từ kết quả của bảng 2 cho thấy hàm lượng flavonoid tăng theo thời gian chiết. Thời gian chiết từ 60 phút đến 90 phút, hàm lượng flavonoid tăng cao từ 15,88% lên 16,35%, tiếp tục tăng thời gian chiết từ 90 phút đến 120 phút hàm lượng flavonoid chỉ tăng 0,03%.

Chiết ở thời gian là 120 phút cho kết quả cao hơn khi chiết ở 90 phút. Tuy nhiên xử lý số liệu hàm lượng flavonoid của 2 công thức trên không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy chúng tôi chọn thời gian chiết thích hợp là 90 phút để tiết kiệm thời gian, chi phí cho quá trình chiết.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng flavonoid tổng số

Công thức	Thời gian chiết (phút)	Hàm lượng flavonoid tổng số (%)
CT1	60	15,88 ^b ± 0,024
CT2	90	16,35 ^a ± 0,035
CT3	120	16,4 ^a ± 0,07

Ghi chú: Các chữ số trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha < 0,05$

Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Qua bảng 3 cho thấy hàm lượng flavonoid trong dịch chiết tăng nhanh ở khoảng nhiệt độ từ 70 đến 80°C, hàm lượng tăng cao từ 16,77% lên 17,26%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 90°C thì hàm lượng flavonoid có xu hướng giảm. Hàm lượng flavonoid thu được cao nhất ở nhiệt độ 80°C. Theo Spigno và đồng tác giả (2007) [7], nhiệt độ trích ly tác động đến khả năng hòa tan, tốc

độ truyền khối và sự ổn định của các hợp chất polyphenol. Phạm Thanh Kỳ (1995) [6], dưới một giới hạn nhất định, nhiệt độ cao nâng cao hiệu quả trích ly do tăng cường mức độ khuếch tán và độ hòa tan các chất phân tích trong dung môi. Vượt qua giới hạn nhất định đó nhiệt độ trích ly cao sẽ làm giảm hàm lượng polyphenol. Vì vậy nhiệt độ chiết thích hợp cho quá trình chiết là 80°C.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng flavonoid tổng số

Công thức	Nhiệt độ chiết (°C)	Hàm lượng flavonoid tổng số (%)
CT1	70	16,77 ^c ± 0,031
CT2	80	17,26 ^a ± 0,04
CT3	90	16,58 ^b ± 0,054

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha < 0,05$

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi

Qua bảng 4 cho thấy hàm lượng flavonoid trong dịch chiết tăng lên khi tỉ lệ: Nguyên liệu/dung môi tăng. Từ tỉ lệ 1/10 đến 1/15, hàm lượng flavonoid tăng nhanh nhưng từ tỉ lệ 1/15 đến 1/20 thì hàm lượng flavonoid lại tăng chậm. Đạt hàm lượng flavonoid cao nhất 17,55% ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20. Tuy nhiên hàm lượng flavonoid ở công thức tỉ lệ 1/15 và 1/20 sự sai khác không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy chúng tôi chọn tỉ lệ nguyên liệu:dung môi thích hợp là 1/15 để tiết kiệm dung môi.

Tối ưu hóa quá trình tách chiết

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện chiết tách, chúng tôi nhận thấy nồng độ dung môi, thời gian chiết, nhiệt độ chiết là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách. Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ. Các số liệu được xử lý trên phần mềm Design- Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh giá cao thu được.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng flavonoid tổng số

Công thức	Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	Hàm lượng flavonoid tổng số (%)
CT1	1/10	17,01 ^b ± 0,025
CT2	1/15	17,52 ^a ± 0,017
CT3	1/20	17,55 ^a ± 0,036

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha < 0,05$

Bảng 5. Ma trận thực nghiệm Box-Behnken ba yếu tố của chè dây

TN	Biến thực			Hàm lượng flavonoid tổng số (%)
	A (nồng độ)	B (Thời gian)	C (nhiệt độ)	
1	68	75	80	15,47 ± 0,02
2	72	75	80	14,12 ± 0,074
3	68	105	80	15,29 ± 0,137
4	72	105	80	16,68 ± 0,03
5	68	90	77	12,32 ± 0,054
6	72	90	77	12,25 ± 0,061
7	68	90	83	12,98 ± 0,371
8	72	90	83	9,58 ± 0,054
9	70	75	77	11,57 ± 0,274
10	70	105	77	12,59 ± 0,119
11	70	75	83	10,94 ± 0,153
12	70	105	83	11,49 ± 0,217
13	70	90	80	17,5 ± 0,127
14	70	90	80	17 ± 0,354
15	70	90	80	17,82 ± 0,114
16	70	90	80	17,56 ± 0,127
17	70	90	80	17,38 ± 0,054

Tiến hành giải bài toán tối ưu theo phương pháp "hàm mong đợi". Sử dụng phần mềm Design-Expert 7.0 để tiến hành tối ưu hóa nhằm xác định được giá trị của ba yếu tố mà tại đó hàm lượng flavonoid tổng số là cao nhất. Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện hàm lượng flavonoid: $Y = 17,45 - 0,43*A + 0,49*B - 0,47*C - 0,96*A^2 - 1,10*B^2 - 4,71*C^2 + 0,68*A*B - 0,83*A*C - 0,12*B*C$.

Hay $Y = 17,45 - 0,43*Nồng độ + 0,49*Thời gian - 0,47*Nhiệt độ - 0,96*Nồng độ^2 - 1,10*Thời gian^2 - 4,71*Nhiệt độ^2 + 0,68*Nồng độ*Thời gian - 0,83*Nồng độ*Nhiệt độ - 0,12*Thời gian*Nhiệt độ$

Trong đó Y là hàm lượng flavonoid tổng số trong dịch chiết dự báo thu được.

Để đánh giá mô hình chúng tôi sử dụng phân tích ANOVA. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua bảng sau:

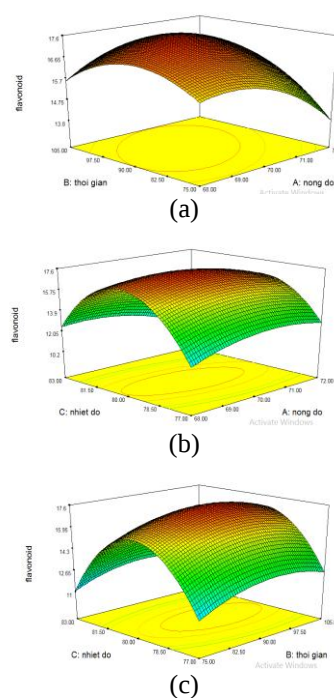
Bảng 6. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình cao chè dây

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị p
Model	117,78	9	13,09	46,02	<0,0001
A	1,47	1	1,47	5,17	0,0571
B	1,95	1	1,95	6,86	0,0345
C	1,75	1	1,75	6,15	0,0422
AB	1,88	1	1,88	6,6	0,0371
AC	2,77	1	2,77	9,75	0,0168
BC	0,0055	1	0,055	0,19	0,6727
A ²	3,91	1	3,91	13,74	0,0076
B ²	5,08	1	5,08	17,87	0,0039
C ²	93,25	1	93,25	327,89	<0,0001
Residual	1,99	7	0,28		
Lack of Fit	1,63	3	0,54	6,06	0,0571
Sai số (pure error)	0,36	4	0,09		
SS tổng số	119,77	16			

SS: Tổng phương sai; DF: Bậc tự do; MS: Trung bình phương sai; chuẩn F: Chuẩn Fisher; Residual: Phần dư, "Lack of Fit": Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm

Từ kết quả phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value = 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn để giải thích cho

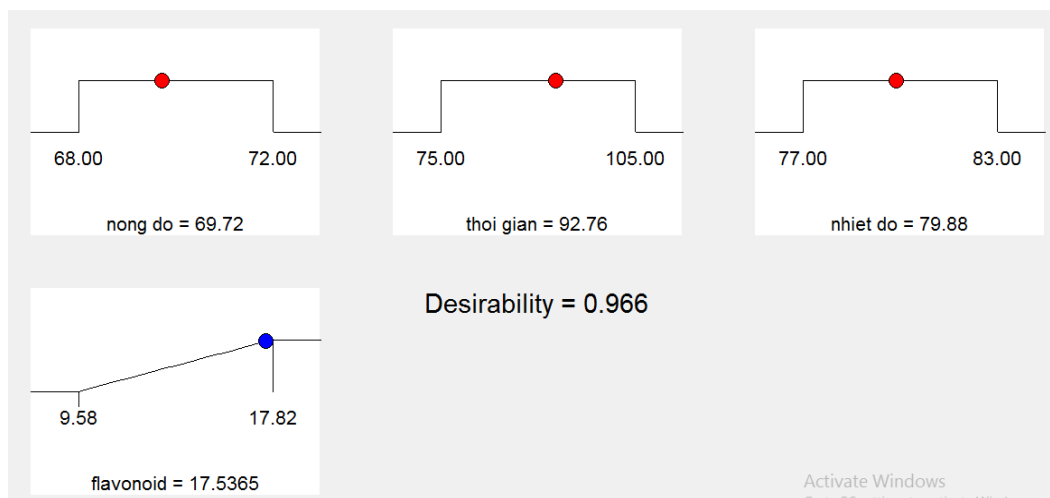
kết quả của thí nghiệm, Lack of fit test = 0,0571 (not significant) có ý nghĩa đối với mô hình.



Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng flavonoid của cao chè dây

a) Mô hình tương tác giữa nồng độ và thời gian; b) Mô hình tương tác giữa nồng độ và nhiệt độ; c) Mô hình tương tác giữa thời gian và nhiệt độ

Phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ 69,72%, thời gian 92,76 phút, nhiệt độ 79,88°C khi đó hàm lượng flavonoid tổng số đạt 17,53%. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm cho kết quả tương ứng.



Hình 2. Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu hàm lượng flavonoid trong dịch chiết

KẾT LUẬN

Điều kiện tách chiết thích hợp để thu được hàm lượng flavonoid được xác định như sau: Nồng độ ethanol 70%, thời gian chiết 90 phút, nhiệt độ 80°C, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/15 (w/v). Chúng tôi sử dụng phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ cho phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ 69,72%, thời gian 92,76 phút, nhiệt độ 79,88°C khi đó hàm lượng flavonoid tổng số đạt 17,53%. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm có độ tương thích cao. Kết quả của chúng tôi đã tìm ra được điều kiện tối ưu để tách chiết flavonoid cho hàm lượng cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phùng Khắc Cam và Nguyễn Thái Sơn (2003), *Helicobacter pylori và bệnh viêm, loét dạ dày tá tràng*, Nxb Y học.
2. Nguyễn Xuân Duy (2015), “Ảnh hưởng của điều kiện tách chiết tới hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của cây diệp hạ châu trồng tại Phú Yên”, *Tạp chí khoa học và phát triển*, 13(7), tr. 1144-1152.
3. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, Nxb Y học.
4. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học.
5. Phùng Thị Vinh (1995), *Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chè dây Ampelopsis cantonensis Planch*, Luận án tiến sĩ – Trường Đại học Dược Hà Nội.
6. Phạm Thanh Kỳ (1995), *Nghiên cứu cây chè dây làm thuốc điều trị bệnh loét dạ dày- hành tá tràng*, Đề tài cấp Bộ - Trường Đại học Dược Hà Nội.
7. Spigno G. Tramelli, L. De Faveri, D. M. (2007), “Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics”, *Journal of Food Engineering*, 81, pp. 200-208.

SUMMARY

OPTIMIZE THE EXTRACTION PROCESS OF FLAVONOID FROM AMPELOPSIS CANTONENSIS IN CAO BANG PROVINCE

**Luu Hong Son*, Pham Thi Vinh, Dinh Thi Kim Hoa,
Pham Thi Phuong, Nguyen Van Duy, Tran Van Chi, Ta Thi Luong**
TNU - University of Agriculture and Forestry

The purpose of this study was to investigate the one way ethanol concentrations, time, temperature and the ratio of material/solvent extraction, which affected the extraction process of flavonoids from *Ampelopsis cantonensis*, resulting in 70%; 90 minutes; 80°C; 1/15 (w/v). On the basis of the factors affecting the extraction conditions, we found that the solvent concentration, extraction time and extraction temperature strongly influence the extraction process. Application of Box-Behnken design found the optimal condition for the extraction process of *Ampelopsis cantonensis* with ethanol at concentration of 69.72%, extraction time 92.75 minute, extraction temperature of 79.88°C, which created the amount of flavonoids of 17.53%. Experimental results showed high degree of compatibility with the model.

Keywords: Cao Bang province, *Ampelopsis cantonensis*, extraction, flavonoids, optimize

Ngày nhận bài: 20/7/2017; **Ngày phản biện:** 10/8/2017; **Ngày duyệt đăng:** 31/10/2017

* Tel: 0973 919486, Email: Luuson.vp@gmail.com