

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT FLAVONOID TỪ CÂY GAI XANH CAO BẰNG

Trần Văn Chí¹, Nguyễn Sinh Huỳnh², Lưu Hồng Sơn¹,
Nguyễn Thị Hồng Ngọc^{1*}, Vũ Thị Diệp¹

¹Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

²Công ty Cổ phần Giống và Thức ăn chăn nuôi Cao Bằng

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là khảo sát đơn yếu tố nồng độ dung môi ethanol, thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi chiết, ảnh hưởng tới quá trình tách chiết flavonoid từ cây gai xanh 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 thì nồng độ dung môi, thời gian chiết và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi là những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm BoxBehnken đã tìm được điều kiện tối ưu quá trình tách chiết flavonoid từ cây gai xanh sử dụng ethanol 71,33%, thời gian tách chiết 94 phút, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/15,67; hàm lượng flavonoid theo những điều kiện trên là 36,17%. Kết quả thực nghiệm cho kết quả có độ tương thích cao với mô hình.

Từ khóa: Cao Bằng, cây gai xanh, flavonoid, tách chiết, tối ưu

Ngày nhận bài: 19/4/2019; Ngày hoàn thiện: 25/9/2019; Ngày đăng: 17/10/2019

OPTIMIZE THE EXTRACTION PROCESS OF FLAVONOID FROM BOHENIVEA L. GAUD IN CAO BANG PROVINCE

Tran Van Chi¹, Nguyen Sinh Huynh², Luu Hong Son¹,
Nguyen Thi Hong Ngoc^{1*}, Vu Thi Diep¹

¹University of Agriculture and Forestry – TNU,

²Cao Bang Breeding and Feed Joint Stock Company (CABACO)

ABSTRACT

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 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud, 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 material/solvent ratio strongly influence the extraction process. Application of Box-Behnken design found the optimal condition for the extraction process of *Boehmeria nivea* (L.) Gaud with ethanol at concentration of 71.33%, extraction time 94 minute, material/solvent ratio 1/15.67 which created the amount of flavonoids of 36.17%. Experimental results showed high degree of compatibility with the model.

Keywords: Cao Bang province, *Boehmeria nivea* (L.) Gaud, extraction, flavonoids, optimize

Received: 19/4/2019; Revised: 25/9/2019; Published: 17/10/2019

* Corresponding author. Email: luuhongson@tuaf.edu.vn

1. Mở đầu

Cây gai xanh (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud) là loại thuốc – dược liệu quý chủ trị động thai, ra huyết, đái đục, đái ra máu, bong màng nuôi thai, có tác dụng rất tốt cho phụ nữ mang thai được nêu trong cuốn “ Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam” của Đỗ Tất Lợi (2004) [1]. Các nghiên cứu đã xác định thành phần hóa học chính trong cây gai xanh flavonoid, apigenin, axit hữu cơ và nhiều thành phần dinh dưỡng khác như khoáng chất, protein, vitamin [2]. Trong đó nhóm flavonoid rất được quan tâm nghiên cứu. Flavonoid từ cây gai xanh được biết đến với đặc tính chống oxy hóa, chống viêm, chống khối u, chống vi khuẩn, chống virus và chống dị ứng [3].

Việc tách chiết flavonoid từ cây gai xanh chịu ảnh hưởng bởi dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết và tỷ lệ nguyên liệu/ dung môi. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là nhằm tối ưu hóa quá trình tách chiết flavonoid tổng số từ cây gai xanh Cao Bằng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây gai xanh tươi (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud) được thu mua tại xã Cao Bình, huyện Hòa An, 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).

2.2. Bố trí thí nghiệm

Flavonoid được chiết từ cây gai xanh 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, lựa chọn 03 yếu tố là các yếu tố ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng flavonoid tổng số, để đánh giá

khả năng ảnh hưởng của chúng, phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box - Behnken với ba yếu tố, ba cấp độ được sử dụng.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng flavonoid tổng số bằng phương pháp cân

Cân chính xác 2 g bột cây gai chiết trong bình Soxhlet bằng este dầu hỏa để loại chlorophyll (trong 2 giờ). Sau đó lấy túi chứa bột cây gai 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 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 [4]:

$$X(\%) = \frac{b}{a} \times 100\% \quad (1)$$

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)

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

Nguyên tắc: Sấy mẫu đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 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:

$$W(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (2)$$

Trong đó:

W: Độ ẩm (%)

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

m_2 : Khối lượng mẫu và chén sứ sau khi sấy (g)

m_0 : Khối lượng của chén sứ (g)

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 20.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol

Ethanol có khả năng chiết xuất hầu hết thành phần của nguyên liệu cao hơn nước. Vì vậy dung môi được sử dụng việc chiết tách dịch cây gai xanh là ethanol. Tiến hành nghiên cứu với các nồng độ khác nhau là 60%, 70%, 80%. Sau đó tiến hành phân tích hàm lượng flavonoid tổng số trong dịch chiết, kết quả thu được về hàm lượng flavonoid được thể hiện ở bảng 1.

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 35,58mg, tiếp tục tăng nồng độ ethanol lên 80% thì hàm lượng flavonoid không tăng mà lại giảm (34,69 mg). Lưu Hồng Sơn (2017) [5], khi nghiên cứu tối ưu hóa flavonoid từ cây chè dây Cao Bằng nhận thấy, nồng độ ethanol 70% cho hàm lượng flavonoid cao nhất.

Do vậy từ kết quả nghiên cứu trên, CT2 với nồng độ ethanol là 70% được lựa chọn để thực hiện quá trình chiết flavonoid trong cây gai xanh.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian chiết

Sau khi tìm được nồng độ ethanol thích hợp trong quá trình tách chiết flavonoid từ cây gai xanh các khoảng thời gian tách chiết là 60, 90, 120 phút được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu. Sau đó, phân tích hàm lượng flavonoid tổng số. Kết quả thu được về hàm lượng flavonoid được thể hiện ở bảng 2.

Qua bảng 2 ta thấy, thời gian tách chiết có ảnh hưởng tới hàm lượng flavonoid tổng số. Nhìn chung khi tăng thời gian tách chiết, hàm lượng flavonoid tổng số thu được tăng. Hàm lượng flavonoid tổng số thu được ở CT2 và CT3 cao hơn so với CT1, nhưng giữa CT2 và CT3 lại không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, mặc dù CT3 thời gian tách chiết dài hơn CT2 là 30 phút. Điều này có thể giải thích là do trong thời gian 90 phút hàm lượng flavonoid đã được tách chiết triệt để.

Từ nhận xét trên, để giảm thời gian sản xuất, tiết kiệm chi phí, thì thời gian tách chiết flavonoid tổng số được lựa chọn là 90 phút.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Để xác định được nhiệt độ tách chiết flavonoid phù hợp, tiến hành tách chiết nguyên liệu trong điều kiện cố định các yếu tố công nghệ đã xác định được ở các thí nghiệm 1 và 2 trong các nhiệt độ khác nhau lần lượt là: 70°C, 80°C, 90°C. Sau 90 phút tiến hành đo hàm lượng flavonoid tổng số, thu được kết quả thể hiện ở bảng 3.

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 (mg)
CT1	60	33,5 ^a
CT2	70	35,58 ^b
CT3	80	34,69 ^a

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

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

Công thức	Thời gian (phút)	Hàm lượng flavonoid tổng số (mg)
CT1	60	31,5 ^a
CT2	90	35,46 ^b
CT3	120	36,12 ^b

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

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

Công thức	Nhiệt độ °C	Hàm lượng flavonoid tổng số (mg)
CT1	70	33,78 ^a
CT2	80	35,12^a
CT3	90	35,08 ^a

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

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

Công thức	Tỷ lệ dung môi/nguyên liệu	Hàm lượng flavonoid tổng số (mg)
CT1	10:1	32,45 ^a
CT2	15:1	36,05^b
CT3	20:1	32,02 ^a

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 chiết cây gai xanh

TN	Biến thực			Hàm lượng flavonoid tổng số (mg)
	A (ethanol)	B (thời gian)	C (tỷ lệ dung môi)	
1	60	60	15	34.51
2	80	60	15	33.02
3	60	120	15	34.69
4	80	120	15	35.05
5	60	90	10	31.25
6	80	90	10	35.58
7	60	90	20	33.86
8	80	90	20	34.09
9	70	60	10	34.27
10	70	120	10	35.05
11	70	60	20	34.46
12	70	120	20	36.12
13	70	90	15	36.05
14	70	90	15	36.05
15	70	90	15	36.05
16	70	90	15	36.05
17	70	90	15	36.05

Dựa vào kết quả bảng 3, nhận thấy nhiệt độ cũng là một yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả tách chiết flavonoid. Khi tăng nhiệt độ tách chiết từ 70°C tới 80°C thì hàm lượng flavonoid tổng số thu được tăng, tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên tới 90°C thì hàm lượng flavonoid thu được thay đổi không đáng kể và có xu hướng giảm đi, hàm lượng flavonoid thu được nằm ở khoảng 35mg. Như vậy, nhiệt độ tối ưu cho sự tách chiết flavonoid là 80°C. Theo Spigno và đồng tác giả (2007) [6], nhiệt độ trích ly tác động đến khả năng hòa tan, tốc độ truyền khối và sự ổn định của các hợp chất polyphenol. Từ kết quả trên, để tránh ảnh hưởng đến sự ổn định của hợp chất flavonoid của cây gai xanh nhiệt độ tối ưu cho quá trình tách chiết được lựa chọn là 80°C.

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu

Sau khi tối ưu được nồng độ ethanol, nhiệt độ và thời gian tách chiết flavonoid, tiến hành nghiên cứu tìm tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp thông qua hàm lượng flavonoid tổng số. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

Dựa vào kết quả ở bảng 4, khi thay đổi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thì hiệu quả tách chiết flavonoid cũng thay đổi và đều khác nhau giữa cả 3 công thức nghiên cứu. Hàm lượng flavonoid thu được cao nhất ở CT2 là 36,05 mg và thấp nhất với CT3 là 32,02 mg.

Từ kết quả nghiên cứu trên, để xây dựng quy trình tách chiết flavonoid từ cây gai xanh thì CT2, với tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 15:1 được lựa chọn.

3.5. Tối ưu hóa quá trình tách chiết

Trên cơ sở khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện tách chiết, những yếu tố ảnh hưởng mạnh đến quá trình chiết tách bao gồm nồng độ dung môi, thời gian chiết và tỷ lệ dung môi. Phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken với ba biến ba cấp độ được sử dụng cho nghiên cứu. Các số liệu được xử lý trên phần mềm Design-Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USD) ANOVA được dùng để đánh giá dịch thu được.

Phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box- Behnken với ba biến ba cấp độ được sử dụng. Các số liệu thu được từ dịch chiết cây gai xanh được xử lý trên phần mềm Design- Expert 7.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) ANOVA được dùng để đánh giá kết quả thu được. 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 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 tổng số:

$$Y = + 36.05 + 0.43*A + 0.58*B + 0.30 *C + 0.46*A*B - 1.02*A*C + 0.22*B*C - 1.51*A^2 - 0.23*B^2 - 0.85*C^2$$

Hay $Y = + 36.05 + 0.43*\text{ethanol} + 0.58*\text{thời gian} + 0.30 * \text{tỷ lệ dung môi} + 0.46*\text{ethanol}*\text{thời gian} - 1.02*\text{ethanol}*\text{tỷ lệ dung môi} + 0.22*\text{thời gian}*\text{tỷ lệ dung môi} - 1.51*\text{ethanol}^2 - 0.23*\text{thời gian}^2 - 0.85*\text{tỷ lệ dung môi}^2$

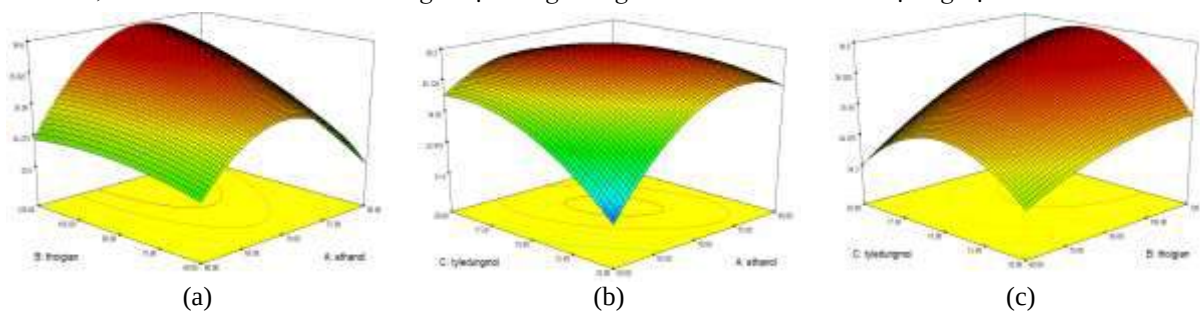
Trong đó Y là hàm lượng flavonoid tổng số trong dịch chiết thu được.

Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình. Kết quả phân tích ANOVA được thể hiện qua **bảng 6**.

Bảng 6. Phân tích phương sai ANOVA của mô hình tách chiết dịch từ cây gai xanh

Nguồn	SS	DF	MS	Chuẩn F	Giá trị p
Model	23.86	9	2.65	4.58	<0.0287
A	1.47	1	1.47	2.54	0.1552
B	2.7	1	2.7	4.66	0.0676
C	0.71	1	0.71	1.22	0.3055
AB	0.86	1	0.86	1.48	0.2637
AC	4.2	1	4.2	7.25	0.0309
BC	0.19	1	0.19	0.33	0.5814
A ²	9.55	1	9.55	16.49	0.0048
B ²	0.22	1	0.22	0.37	0.5612
C ²	3.03	1	3.03	5.33	<0.0560
Residual	4.06	7	0.58		
Lack of Fit	4.06	3	1.35		
Sai số	0.000	4	0.000		
SS tổng số	27.92	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



Hình 1. Bề mặt đáp ứng hàm lượng flavonoid tổng số

(a) Mô hình tương tác giữa ethanol và thời gian; (b) Mô hình tương tác giữa ethanol và tỷ lệ dung môi; (c) Mô hình tương tác giữa thời gian và tỷ lệ dung môi.

Phương án tốt nhất được dự đoán hàm lượng ethanol là 71,33%, thời gian là 94 phút, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 15,67 khi đó hàm lượng flavonoid đạt 36,17. Kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm cho kết quả tương ứng (Hình 1 và hình 2).



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

4. 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 là 90 phút, tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu là 15/1, nhiệt độ là 80°C. Phương pháp bề mặt chỉ tiêu theo thiết kế thí nghiệm của Box-Behnken được sử dụng với ba biến ba cấp độ cho phương án tốt nhất được dự đoán nồng độ ethanol 71,33%, thời gian 94 phút, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 15,67/1 khi đó hàm lượng flavonoid tổng số đạt 36,17 mg. 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]. Đỗ Tất Lợi, *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, 2004.
- [2]. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M., *Analysis of total phenols and*

other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. In: Packer L, editor. *Oxidants and Antioxidants*, Pt A. pp. 152–178, 1999.

- [3]. Dong Gu Lee, “Quantitative Analysis of the Flavonoid Content in the Leaves of *Boehmeria nivea* and Related Commercial Products”, *Natural Product Sciences*, 21(1), pp. 66-70, 2015.

- [4]. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu, *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, Nxb Y học, 1985.

- [5]. Lưu Hồng Sơn, “Tối ưu hóa quá trình tách chiết Flavonoid từ chè dây Cao Bằng”, *Tạp chí Khoa học và công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 171(11), tr. 15-19, 2017.

- [6]. Jingchen Wei, Lianku Lin, Xiaojian Su, “Anti-hepatitis B virus activity of *Boehmeria nivea* leaf extracts in human HepG2.2.15 cells”, *Biomedical Reports*, 2, pp. 147-151, 2014.

- [7]. Spigno G. Tramelli, L. De Faveri, D. M., “Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics”, *Journal of Food Engineering*, 81, pp. 200-208, 2007.