

TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY LUTEIN CÓ HỖ TRỢ SIÊU ÂM TỪ LÁ ĐÌNH LĂNG *Polyscias fruticosa* (L.) Harms

La Bội Sương, Nguyễn Cẩm Hường, Hoàng Thị Ngọc Nhơn*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: nhonhtn@fst.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/5/2022; Ngày chấp nhận đăng: 15/6/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định được các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly lutein từ lá đình lăng *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. Các yếu tố khảo sát gồm: loại dung môi (methanol, ethanol, n-hexan), tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (10/1, 20/1, 30/1, 40/1 và 50/1, v/w), công suất siêu âm (150, 187,5, 225, 262,5, 300 W) và thời gian siêu âm (15, 20, 25, 30, 35 phút). Hiệu suất trích ly được thể hiện qua hàm lượng lutein thu được bằng phương pháp quang phổ UV-Vis. Từ đó tiến hành tối ưu các điều kiện trích ly lutein như tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, công suất siêu âm và thời gian siêu âm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Kết quả cho thấy tại điều kiện tối ưu, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu 20,16/1 (v/w), công suất siêu âm 249,38 W và thời gian siêu âm 31,6 phút thu được hàm lượng lutein là $592,95 \pm 2,13$ mg/kg CK.

Từ khóa: Đình lăng, lutein, *Polyscias fruticosa* (L.) Harms, trích ly, siêu âm.

1. MỞ ĐẦU

Đình lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) có nguồn gốc ở vùng đảo Polynesie, Thái Bình Dương. Cây được trồng ở Malaysia, Indonesia, Campuchia, Lào hay các nước nhiệt đới khác để làm gia vị, làm cây cảnh và làm thuốc. Ở Việt Nam, cây đình lăng được trồng phổ biến ở Nam Định, Thái Bình, Tuyên Quang, Hà Giang, Cao Bằng, Yên Bái... Đình lăng là cây sống nhiều năm, ưa ẩm, ưa sáng nhưng cũng chịu hạn, chịu bóng nhưng không chịu ngập úng. Cây có biên độ sinh thái rộng, phân bố trên khắp các vùng sinh thái, có thể phát triển trên nhiều loại đất nhưng tốt nhất là đất pha cát. Rễ đình lăng có vị ngọt, tính bình, được dùng làm thuốc bổ tăng lực, chữa cơ thể suy nhược, gầy yếu, mệt mỏi, tiêu hóa kém, phụ nữ sau khi sinh ít sữa. Lá đình lăng có vị nhạt, hơi đắng, tính bình, có tác dụng chữa cảm sốt, mụn nhọt sưng tấy, dị ứng mẩn ngứa, vết thương. Thân và cành chữa thấp khớp, đau lưng. Dược liệu có tác dụng bổ tạng, tiêu thực, tiêu sưng viêm, giải độc, bổ huyết, tăng sữa. Ở Ấn Độ, đình lăng được dùng làm thuốc trị sốt. Rễ và lá có tác dụng lợi tiểu chữa sỏi thận, sỏi bàng quang. Bột lá được giã với muối đắp vết thương [1]. Ở Campuchia, lá đình lăng được phối hợp với các cây thuốc khác làm bột hạ nhiệt, thuốc giảm đau. Lá dùng để xông ra mồ hôi, chữa chứng chóng mặt, dùng tươi hoặc giã nát đắp ngoài trị viêm thần kinh khớp và vết thương. Vỏ rễ và lá đình lăng chứa saponin, alkaloid, các vitamin B1, B2, B6, vitamin C, 20 acid amin, glycosid, phytosterol, tanin, acid hữu cơ, tinh dầu, nhiều nguyên tố vi lượng và 21,10% đường. Trong lá còn có saponin triterpen (1,65%) và acid oleanolic [2], carotenoid (0,21 mg/g).

Lutein là một xanthophyll hay còn gọi là oxycarotenoid, là một họ carotenoid được oxy hóa có chứa các nhóm hydroxyl hoặc cacbonyl góp phần tăng khả năng hòa tan. Lutein và zeaxanthin là carotenoid duy nhất được hấp thụ vào máu sau khi uống [3]. Lutein chỉ được tổng hợp bởi thực vật, do đó sự hiện diện của nó trong mô của con người hoàn toàn có nguồn

gốc từ chế độ ăn uống. Sự phân bố lutein giữa các mô tương tự như các carotenoid khác, nhưng cùng với zeaxanthin, chúng được tìm thấy một cách chọn lọc ở trung tâm của võng mạc, thường gọi là sắc tố điểm vàng. Lutein không có hoạt tính vitamin A ở người nhưng nó thể hiện các hoạt động sinh học thu hút sự chú ý lớn liên quan đến sức khỏe con người [4]. Trong thực vật, lutein hoạt động như một sắc tố phụ bằng cách hấp thụ năng lượng ánh sáng trong vùng ánh sáng xanh và chuyển nó thành diệp lục. Hơn nữa, carotenoid (chứa lutein) tham gia vào quá trình bảo vệ quang, có nghĩa là loại bỏ hư hỏng do quá trình oxy hóa quang do chiếu sáng quá mức [5]. Lutein là một chất chống oxy hóa khá mạnh, có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tác hại của tia tử ngoại, ngăn ngừa thoái hóa võng mạc, đục thủy tinh thể ở người già... [6, 7]. Nhiều công trình nghiên cứu chứng minh lutein có thể làm giảm nguy cơ xơ vữa động mạch. Lượng lutein trong động mạch càng cao, sự dày lên của thành động mạch càng thấp. Ngoài ra lutein còn làm giảm quá trình oxy hóa cholesterol LDL (Low Density Lipoprotein), từ đó làm giảm nguy cơ tắc nghẽn, xơ vữa động mạch [7]. Lutein có tác dụng hỗ trợ chống lại các bệnh về mắt khi về già như thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi (AMD), đục thủy tinh thể, thoái hóa võng mạc [8, 9]. Trong thực phẩm, lutein ở dạng chế phẩm hòa tan trong nước được sử dụng để nhuộm vỏ ngoài cho giò chả, các bán thành phẩm từ thịt gà, bánh nướng, kẹo, nước giải khát, các sản phẩm từ sữa, thực phẩm cho trẻ sơ sinh và trẻ mới biết đi.

Lutein hiện được trích ly chủ yếu từ hoa cúc vạn thọ bằng các phương pháp như trích ly dung môi, trích ly có hỗ trợ enzyme [10]. Rong cũng là một nguyên liệu giàu lutein đang được khai thác mạnh với một số phương pháp như sử dụng dung môi hữu cơ [11], trích ly có hỗ trợ siêu âm [12] hay chiết xuất siêu tới hạn (SFE) [13]. Hà Thị Bích Ngọc và cộng sự (2007) đã nghiên cứu định lượng hợp chất carotenoid trong một số thực vật tại Việt Nam bằng phương pháp HPLC đã đưa ra kết quả rằng lutein chiếm 50,76% trong lá đinh lăng [14]. Lutein chiếm hàm lượng đáng kể trong lá đinh lăng, đây cũng là nguồn nguyên liệu phong phú tại Việt Nam, do đó việc tận dụng nguồn nguyên liệu này để nghiên cứu trích ly hợp chất sinh học này là điều cần thiết hiện nay.

Trích ly lutein bằng phương pháp sử dụng dung môi thông thường có một số nhược điểm như thời gian dài, lượng dung môi sử dụng nhiều, hiệu suất trích thấp. Phương pháp trích ly lutein từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên có hỗ trợ siêu âm được ứng dụng rộng rãi do giảm thời gian trích, hiệu suất trích tăng đáng kể [15, 16]. Quá trình trích ly bị ảnh hưởng bởi các yếu tố trích như loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, công suất và thời gian siêu âm [17]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các yếu tố cơ bản của quá trình trích ly có hỗ trợ siêu âm cũng như các điều kiện tối ưu của quá trình trích lutein từ lá đinh lăng *P. fruticosa* (L.) Harms, từ đó làm nền tảng để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng hợp chất sinh học này vào thực tiễn.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Nguyên liệu

Lá đinh lăng *P. fruticosa* (L.) Harms được thu nhận trên những cây từ 3 năm tuổi tại Xã Pong Đrang, huyện Krông Buk, tỉnh Đắk Lắk được trồng dưới điều kiện VietGAP. Sau khi thu hái, được vận chuyển trong ngày đến phòng thí nghiệm. Tại đây, nguyên liệu được xử lý, loại bỏ lá sâu, vàng úa và phân loại. Những lá có chiều dài khoảng 10-12 cm được rửa bằng nước máy để loại bỏ tạp chất, sau đó được rửa lại bằng nước cất. Nguyên liệu được để ráo nước và tiến hành sấy khô ở 60 °C cho đến khi đạt độ ẩm dưới 10%, sau đó đem xay mịn bằng máy xay cơ học, sàng qua rây có cỡ lỗ 0,5 mm để sàng lọc kích thước và bảo quản trong túi

PE, bảo quản ở điều kiện tránh ánh sáng và ẩm. Mẫu bột lá đinh lăng được sử dụng trong toàn bộ thí nghiệm.

2.1.2. Hóa chất

Methanol 99,7%, ethanol 99,5%, N-hexan 99,5%, butylated hydroxytoluene (BHT) 80% (Merck). Các hóa chất khác dùng trong nghiên cứu đều đạt yêu cầu kỹ thuật hóa chất phân tích.

2.1.3. Thiết bị

Thiết bị siêu âm được sử dụng là thanh siêu âm VC 750 (Sonics & Material Inc., Newtown, Mỹ) với tần số 20 kHz, công suất tối đa là 750 W. Thiết bị phát sóng siêu âm gồm 3 bộ phận: bộ phận chuyển phần lớn điện năng thành dòng điện xoay chiều tần số cao để vận hành bộ phận biến đổi; bộ phận biến đổi chuyển dòng điện xoay chiều tần số cao thành những dao động; bộ phận truyền sóng sẽ truyền những dao động vào lòng dung môi. Thiết bị cho phép cài đặt công suất đầu ra từ 20% - 40% so với công suất tối đa.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi đến quá trình trích ly

Cân 1 g nguyên liệu (tính theo khối lượng chất khô), tiến hành trích ly lần lượt với các dung môi khảo sát (methanol, ethanol và n-hexan) với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (DM/NL) là 10/1 (v/w), bổ sung thêm 0,1% BHT (w/v) nhằm ngăn chặn sự thất thoát lutein do oxy hóa trong quá trình trích ly [18]. Sau đó, mẫu được siêu âm ở công suất 225 W, thời gian 15 phút. Sau khi siêu âm, mẫu tiếp tục được ủ trong điều kiện tối ở 50 °C trong 60 phút bằng thiết bị bể ổn nhiệt, dịch chiết thu được đem lọc để thu dịch trong. Dịch trích của 3 loại dung môi được chấm trên bản mỏng silica, pha động là n-hexan:etyl acetate. Dựa vào khả năng phân tách các chất trên bản mỏng để lựa chọn loại dung môi phù hợp cho quá trình trích ly lutein từ lá đinh lăng.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ DM/NL, công suất và thời gian siêu âm đến trích ly lutein

Tiến hành cân 1 g nguyên liệu đã xử lý (tính theo khối lượng chất khô), tiến hành trích ly với dung môi đã chọn ở thí nghiệm trên theo tỷ lệ DM/NL khảo sát lần lượt là (10/1, 20/1, 30/1, 40/1 và 50/1, v/w), bổ sung thêm 0,1% BHT (w/v). Sau đó, mẫu được siêu âm ở các công suất khảo sát lần lượt là (150, 187,5, 225, 262,5, 300 W) trong các thời gian (15, 20, 25, 30, 35 phút). Sau khi siêu âm, mẫu tiếp tục được ủ trong điều kiện tối ở 50 °C trong 60 phút bằng thiết bị bể ổn nhiệt, dịch chiết thu được đem lọc để thu dịch trong và tiến hành xác định hàm lượng lutein bằng phương pháp UV-Vis.

2.2.3. Tối ưu hóa trích ly có hỗ trợ siêu âm bằng phương pháp bề mặt đáp ứng

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để xác định sự ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình trích ly có hỗ trợ siêu âm đến hàm lượng lutein. Để tối ưu hóa các điều kiện trích ly lutein, mô hình tâm phức hợp CCD với 3 yếu tố là tỷ lệ DM/NL X_1 (v/w), công suất siêu âm X_2 (W), thời gian siêu âm X_3 (phút) và biến phụ thuộc là hàm lượng lutein (Y, mg/kg chất khô). Các mức thí nghiệm sử dụng được thể hiện qua Bảng 1.

Bảng 1. Các mức thí nghiệm được sử dụng

Thông số	Mức thấp	Mức tâm	Mức cao
Tỷ lệ DM/NL (X_1 , v/w)	10/1	20/1	30/1
Công suất siêu âm (X_2 , W)	187,5	225	262,5
Thời gian (X_3 , phút)	25	30	35

Thí nghiệm được tiến hành với 20 thí nghiệm (8 thí nghiệm ở biên, 6 thí nghiệm tại tâm và 6 thí nghiệm ở cánh tay tròn). Phương trình hồi quy tuyến tính có dạng bậc 2 được xác định bằng phần mềm JMP 10:

$$Y(\%) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{32} + b_{12}(X_1X_2) + b_{13}(X_1X_3) + b_{23}(X_2X_3)$$

Trong đó: $b_0, b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{12}, b_{13}, b_{23}$ là hệ số của biến $X_1, X_2, X_3, X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3$ tương ứng.

2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng lutein tổng số

Hàm lượng lutein được xác định bằng phương pháp UV-Vis, mẫu lá đĩnh lăng sau khi trích ly được lọc thu dịch trích, sau đó pha loãng dịch trích đến tỷ lệ thích hợp rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 445 nm. Hàm lượng lutein được tính theo công thức sau [19, 20]:

$$\text{Lutein TS} = \frac{A \times D \times V \times 10000}{\epsilon \times G}$$

Trong đó:

A: Độ hấp thụ của dung dịch đo quang

V: Thể tích n-hexan dịch chiết sau khi định mức (mL)

D: Hệ số pha loãng

$\epsilon = 2500$: Hệ số hấp thụ trung bình của dung dịch lutein 1% (w/v) đo với cuvet 1 cm ở 445 nm.

G: Khối lượng khô tuyệt đối của mẫu (g)

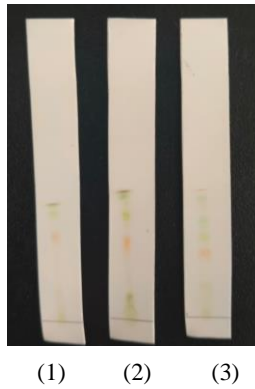
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày bằng giá trị trung bình \pm SD. Sử dụng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0 để phân tích thống kê số liệu thí nghiệm và đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu. Các thí nghiệm tối ưu hóa được xử lý bằng phần mềm JMP 10. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại dung môi

Bản chất của dung môi ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng lutein thu được, đặc biệt là độ phân cực của dung môi. Dung môi có giá trị phân cực gần với cực của chất cần trích ly có khả năng làm tăng hiệu suất trích ly và ngược lại. Do đó, khảo sát loại dung môi trích ly được thực hiện trên 3 loại dung môi là methanol, ethanol và n-hexan.

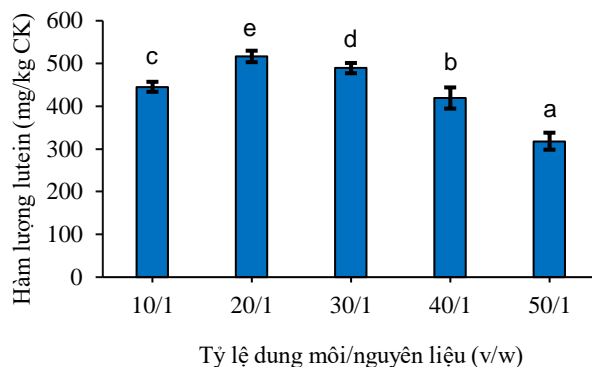


Hình 1. Ảnh hưởng của các loại dung môi n-hexan (1), methanol (2), ethanol (3) đến khả năng phân tách giữa các chất

Để lựa chọn loại dung môi trích ly phù hợp, bản mỏng silica gel (Merck) được sử dụng để so sánh khả năng phân tách các chất khi được trích với các dung môi n-hexan, methanol và ethanol, pha động được sử dụng là n-hexan:etyl acetate. Quan sát bản mỏng cho thấy n-hexan có khả năng phân tách các chất trong dịch trích tốt nhất, vết màu lutein phân tách rõ ràng trên bản mỏng, đồng thời các chất không cần thiết cũng ít hơn so với các dung môi khác, do đó lutein sẽ dễ dàng được thu nhận hơn so với các dung môi còn lại. Sự lựa chọn dung môi được quyết định bởi khả năng hòa tan của chất cần trích trong dung môi mà còn bởi các thông số vật lý như độ nhớt, sức căng bề mặt và áp suất hơi. Sức căng bề mặt cao làm giảm hiện tượng xâm thực khí, ngoài ra áp suất hơi cũng tương quan trực tiếp với các yếu tố như nhiệt độ, điều này cũng ảnh hưởng đến khả năng tạo bọt khí [21]. Capeda và cộng sự (2014) đã tiến hành khảo sát về các phương pháp chiết tách carotenoid và xanthophyll, sau đó họ kết luận rằng n-hexan, acetone là những dung môi thường được sử dụng cho các mẫu có nguồn gốc thực vật [22]. Mặt khác, chiết xuất carotenoid trong dung môi n-hexan ổn định hơn trong các dung môi hữu cơ khác [23]. Do đó, n-hexan được chọn làm dung môi trích ly để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL

Tỷ lệ DM/NL cũng là một thông số quan trọng ảnh hưởng đến hàm lượng lutein thu được. Khi tỷ lệ này càng lớn thì năng suất chiết càng cao. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ này không hợp lý cũng sẽ gây hao phí dung môi và thời gian cô đuổi dung môi càng dài. Thực hiện khảo sát với 5 tỷ lệ DM/NL là 10/1, 20/1, 30/1, 40/1 và 50/1 mL/g (v/w) nhằm tìm ra tỷ lệ mà tại đó hàm lượng lutein thu được là cao nhất.

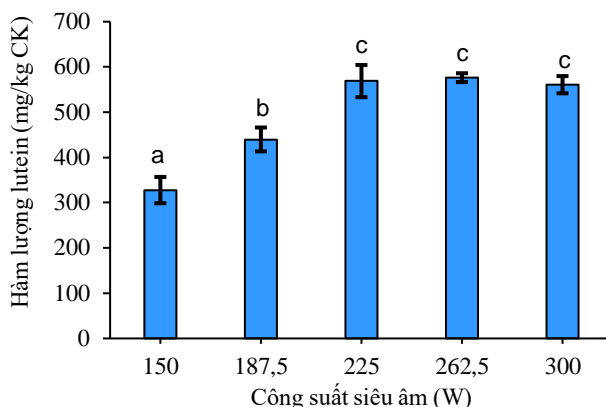


Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/nguyên liệu (v/w) đến hàm lượng lutein
a,b,c,d,e: Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ở $p < 0,05$.

Hình 2 cho thấy khi tăng tỷ lệ DM/NL tăng từ 10/1 lên 30/1 (v/w) thì hàm lượng lutein tăng theo (tăng từ $445,47 \pm 11,71$ mg/kg CK lên $489,20 \pm 12,02$ mg/kg CK). Hiệu suất trích ly đạt cực đại ở tỷ lệ 20/1 (v/w) với hàm lượng lutein thu được là $516,53 \pm 13,41$ mg/kg CK. Khi tăng tỷ lệ DM/NL lên 30/1 (v/w), hàm lượng lutein thu được không có sự khác biệt có ý nghĩa khi phân tích ANOVA với tỷ lệ 20/1 (v/w). Nếu tiếp tục tăng tỷ lệ DM/NL lên 40/1 và 50/1 (v/w), hàm lượng lutein thu được có xu hướng giảm ($419,20 \pm 24,80$ mg/kg CK và $318,13 \pm 19,92$ mg/kg CK). Nguyên nhân có thể là do trong quá trình trích ly cần một lượng dung môi vừa đủ để ngấm vào nguyên liệu, từ đó hòa tan các cấu tử cần trích ly vào dịch trích. Nếu sử dụng quá ít dung môi sẽ không đủ hòa tan triệt để lượng lutein có trong nguyên liệu, tăng dần thể tích dung môi sử dụng thì khả năng khuếch tán của lutein vào dung môi càng lớn. Đó là do sự chênh lệch gradient nồng độ của cấu tử cần trích ly trong nguyên liệu và trong dung môi càng lớn [24]. Tuy nhiên, đến một giới hạn nhất định, khi tăng lượng dung môi thì hàm lượng lutein thu được tăng không đáng kể. Như vậy, tỷ lệ DM/NL 20/1 (v/w) sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm sau. Tương tự kết quả này, tác giả Ofori & Lee (2013) đã tối ưu hóa quá trình trích ly có hỗ trợ siêu âm lutein từ lá cọ, kết quả thu được điều kiện tối ưu là nhiệt độ 30 °C trong 37 phút với tỷ lệ DM/NL là 23/1 (w/v), hàm lượng lutein thu được là $263,22 \pm 3,23$ µg/g [25].

3.3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm

Công suất siêu âm là yếu tố quan trọng trong quá trình trích ly có hỗ trợ siêu âm, do nó ảnh hưởng trực tiếp đến hiện tượng xâm thực khí và phá vỡ thành tế bào, đồng thời tạo nhiệt độ ảnh hưởng đến sự chuyển động phân tử. Tiến hành khảo sát với 5 mức công suất là 150, 187,5; 225; 262,5 và 300 W nhằm tìm ra mức công suất phù hợp, mang lại hiệu suất thu hồi hàm lượng lutein tốt nhất.



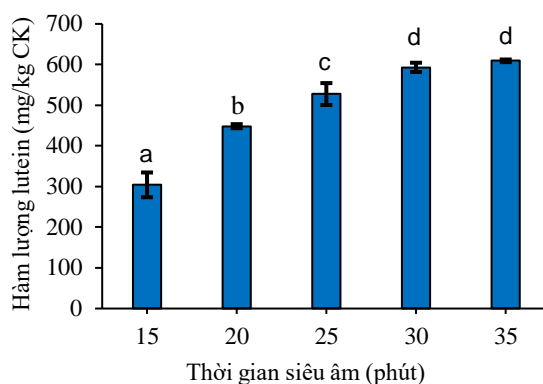
Hình 3. Ảnh hưởng của công suất siêu âm đến hàm lượng lutein
a,b,c: Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ở $p < 0,05$.

Kết quả ở Hình 3 cho thấy khi công suất siêu âm tăng thì hàm lượng lutein cũng tăng. Khi tăng công suất siêu âm từ 150 đến 300 W, hàm lượng lutein tăng đáng kể (từ $327,87 \pm 29,03$ mg/kg CK đến $560,67 \pm 19,04$ mg/kg CK) và đạt hàm lượng cao nhất tại 262,5 W ($576,27 \pm 9,77$ mg/kg CK). Kết quả kiểm định ANOVA cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 mức công suất là 225; 262,5 và 300 W nên công suất 225 W được chọn làm thông số cho các thí nghiệm tiếp theo. Theo Zhang và cộng sự (2008), cường độ siêu âm tăng làm tăng nhiệt độ và áp suất bên trong các bong bóng khí. Sau một thời gian, bong bóng xẹp xuống tạo ra một phản lực làm vỡ thành tế bào và tăng sự thâm nhập của dung môi vào nguyên liệu, từ đó làm tăng hiệu suất trích ly [26]. Cụ thể hơn, sóng siêu âm ở cường độ cao khi truyền vào chất lỏng sẽ làm các phân tử dao động ở biên độ mãnh liệt. Các vi xoáy này sẽ tác động lên những lỗ hổng của tế bào vật liệu, thúc đẩy xảy ra sự khuếch tán ở một vài trường hợp mà khuấy trộn

thông thường không đạt được, từ đó quá trình thoát của các chất hòa tan được xảy ra dễ dàng hơn [27]. Khi công suất siêu âm tăng lên mức vượt ngưỡng, lúc này các bong bóng khí được tạo rất nhiều và liên tục trong dung môi trích ly khiến cho sóng siêu âm tác động lên tế bào vật liệu bị cản trở dẫn đến hàm lượng chất hòa tan thu nhận được không cao.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm

Trong quá trình siêu âm, thời gian các chất tan tiếp xúc với dung môi bị ảnh hưởng nhiều bởi thời gian tương tác giữa 2 pha. Do đó, thời gian cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trích ly lutein từ lá đinh lăng. Thí nghiệm khảo sát trên 5 mức thời gian là 15, 20, 25, 30 và 35 phút để xác định mức thời gian hợp lý để hàm lượng lutein thu được là tốt nhất.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến hàm lượng lutein
a,b,c,d: Các chữ cái khác nhau ở cột thể hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt thống kê ở $p < 0,05$.

Từ kết quả Hình 4 cho thấy, hàm lượng lutein tăng khi tăng thời gian siêu âm. Khi tăng thời gian siêu âm từ 15 phút lên 35 phút, hàm lượng lutein tăng từ $304,13 \pm 30,46$ mg/kg CK lên $609,20 \pm 3,27$ mg/kg CK. Hàm lượng lutein đạt cực đại tại thời gian trích ly 35 phút ($609,20 \pm 3,27$ mg/kg CK). Tuy nhiên, sự chênh lệch lại không có ý nghĩa so với mức thời gian 30 phút khi tiến hành phân tích ANOVA ($p > 0,05$). Quá trình siêu âm gồm 2 giai đoạn là giai đoạn “rửa” và giai đoạn “trích ly chậm” [2]. Giai đoạn đầu tiên đặc trưng bởi tốc độ nhanh và sự thâm nhập của dung môi vào các mô tế bào sau đó kéo theo các thành phần hòa tan vào dung môi trích. Giai đoạn này có thể đạt được tới 90% tổng hàm lượng lutein thu được. Ở giai đoạn kế tiếp, các chất trích hòa tan vào dung môi trích bằng phương pháp khuếch tán. Thời gian siêu âm quá lâu cũng làm giảm lượng lutein do lutein là một chất dễ bị oxy hóa, thời gian siêu âm dài có thể bị phân hủy [28]. Tương tự với kết quả thí nghiệm này, Song và cộng sự đã tiến hành tối ưu hóa quy trình trích ly có hỗ trợ siêu âm lutein từ vỏ bí ngô, kết quả thu được công suất siêu âm là 203W, thời gian là 30 phút với tỷ lệ DM/NL là 31/1 (w/v), hàm lượng lutein thu được là $237,6 \mu\text{g/g}$ [29].

3.5. Tối ưu hóa các thông số trích ly có hỗ trợ siêu âm lutein từ lá đinh lăng

Để xác định được điều kiện trích ly tối ưu lutein, cần tiến hành kết hợp các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích ly đã được khảo sát tại các mục trên gồm tỷ lệ DM/NL, công suất siêu âm và thời gian siêu âm, từ đó tìm ra điều kiện tối ưu khi có sự tương tác giữa các yếu tố. Kết quả của hàm lượng lutein thu được ở các mức thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Bảng ma trận quy hoạch thực nghiệm và kết quả

Số TN	Biến mã hóa			Biến thực			Hàm lượng lutein (mg/kg CK)
	X ₁	X ₂	X ₃	Tỷ lệ DM/NL (v/w)	Công suất siêu âm (W)	Thời gian siêu âm (phút)	
1	-1	-1	-1	10	187,5	25	533,56
2	-1	-1	1	10	187,5	35	543,31
3	-1	1	-1	10	262,5	25	567,21
4	-1	1	1	10	262,5	35	584,89
5	1	-1	-1	30	187,5	25	548,25
6	1	-1	1	30	187,5	35	569,43
7	1	1	-1	30	262,5	25	565,63
8	1	1	1	30	262,5	35	570,49
9	-1,682	0	0	3,18	225	30	543,86
10	1,682	0	0	36,82	225	30	570,02
11	0	-1,682	0	20	161,93	30	550,03
12	0	1,682	0	20	288,07	30	583,12
13	0	0	-1,682	20	225	21,59	552,82
14	0	0	1,682	20	225	38,41	574,24
15	0	0	0	20	225	30	593,48
16	0	0	0	20	225	30	591,78
17	0	0	0	20	225	30	593,51
18	0	0	0	20	225	30	577,12
19	0	0	0	20	225	30	593,3
20	0	0	0	20	225	30	585,55

Bảng 3. Kết quả phân tích ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy

Hệ số hồi quy	Coeff. SC	Std. Err.	P-value
b ₀	589,14	2,51	<0,0001*
b ₁	5,04	1,66	0,0127*
b ₂	10,93	1,66	<0,0001*
b ₃	6,55	1,66	0,0028*
b ₁₂	-7,1	2,17	0,0085*
b ₁₃	-0,17	2,17	0,9385
b ₂₃	-1,05	2,17	0,6399
b ₁₁	-11,46	1,62	<0,0001*
b ₂₂	-8,05	1,62	0,0006*
b ₃₃	-9,13	1,62	0,0002*

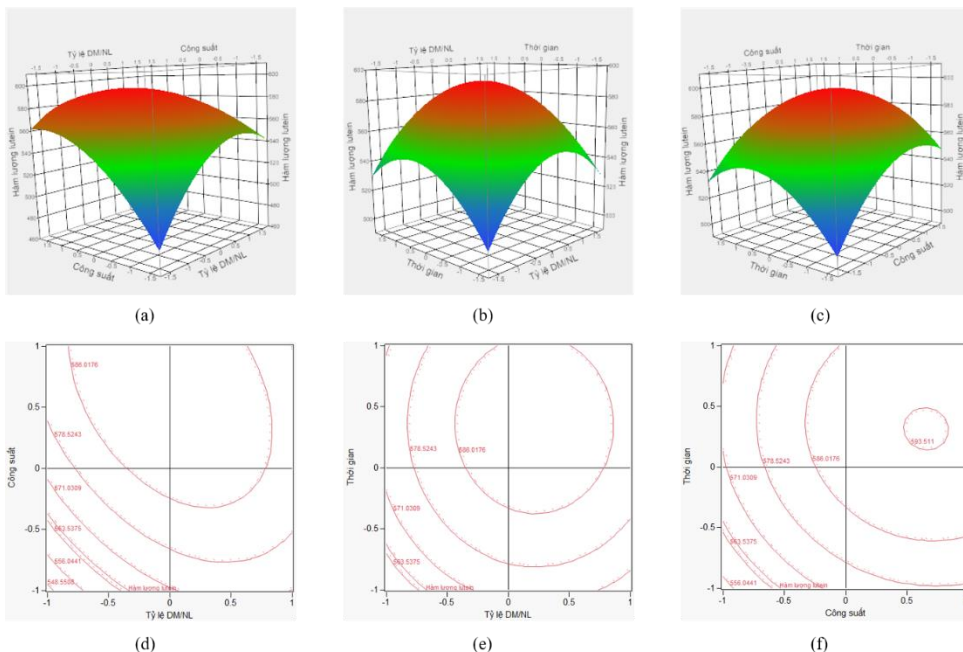
Theo Joglekar và cộng sự, R² cho biết mức độ phù hợp của mô hình và ít nhất phải đạt 0,8 [30]. Ngoài ra, mức độ phù hợp của mô hình cũng được đánh giá bởi giá trị F của Lack of fit. Giá trị P được sử dụng để kiểm tra mức ý nghĩa của từng hệ số hồi quy. Cụ thể, các yếu tố có giá trị P < 0,05 được xem là có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu.

Trong 9 hệ số hồi quy (trừ b_0) có 2 hệ số hồi quy không có ý nghĩa với độ tin cậy $P > 0,05$ là b_{13} và b_{23} , điều này chứng tỏ sự tương tác giữa X_1X_3 và X_2X_3 ảnh hưởng không đáng kể đến hàm mục tiêu. Đối với các giá trị âm, các hệ số hồi quy b_{12} , b_{11} , b_{22} và b_{33} là những yếu tố có tác động tiêu cực đến hàm mục tiêu, làm giảm hàm lượng lutein thu được. Hệ số hồi quy b_2 có giá trị dương lớn nhất, cho thấy X_2 (công suất siêu âm) có tác động tích cực lớn đến hàm mục tiêu.

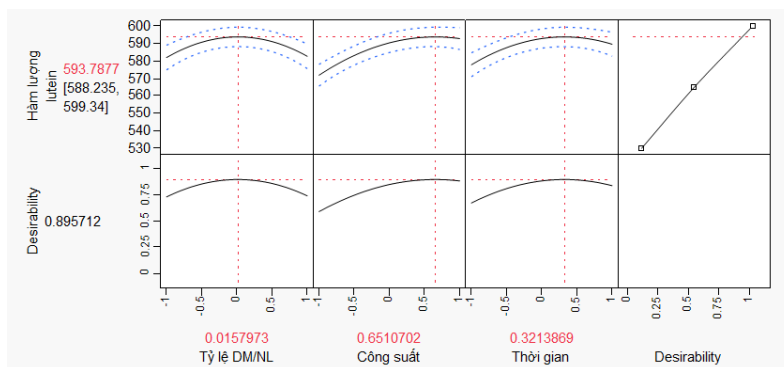
Bảng 3 cũng cho thấy ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL (X_1), công suất siêu âm (X_2) và thời gian siêu âm (X_3) đến hàm lượng lutein thu được, các yếu tố ảnh hưởng theo phương trình đa thức bậc 2. Sau khi phân tích ANOVA bằng phần mềm JMP đã đưa ra phương trình sau:

$$Y = 589,14 + 5,04X_1 + 10,93X_2 + 6,55X_3 - 7,1X_1X_2 - 11,46X_1^2 - 8,05X_2^2 - 9,13X_3^2$$

Sau khi tiến hành phân tích ANOVA bằng JMP, thu được các kết quả sau: hàm lượng lutein đạt cực đại là 593,79 mg/kg CK khi được trích ly tại các điều kiện: tỷ lệ DM/NL 20,16/1 (v/w), công suất siêu âm 249,38 W và thời gian siêu âm 31,6 phút. Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát lên hàm lượng lutein và mô hình dự đoán điều kiện tối ưu được mô phỏng tại Hình 5 và Hình 6. Nguyên nhân là do khi công suất siêu âm tăng sẽ làm tăng áp lực từ đó tăng khả năng phá vỡ thành tế bào trên bề mặt, tạo điều kiện để dung môi thâm thấu tốt hơn và giúp các chất tan thoát ra dễ dàng hơn. Bên cạnh đó, tỷ lệ DM/NL cũng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất trích ly lutein từ lá đinh lăng, khi tăng thể tích dung môi sử dụng thì sự chênh lệch gradient nồng độ của cấu tử cần trích ly giữa nguyên liệu và dung môi càng lớn, từ đó làm tăng khả năng khuếch tán lutein vào dung môi. Thời gian siêu âm càng dài thì khả năng trích ly lutein càng triệt để, kéo theo hàm lượng lutein cũng tăng. Tuy nhiên, khi tỷ lệ DM/NL, công suất siêu âm và thời gian siêu âm quá dài sẽ dẫn đến việc hao hụt dung môi, nồng độ chất tan đạt trạng thái cân bằng nên hàm lượng lutein không tăng mà có xu hướng giảm.



Hình 5. Mô hình bề mặt đáp ứng (a, b, c) và đường đồng mức (d, e, f) thể hiện ảnh hưởng của các yếu tố (tỷ lệ DM/NL, X_1 ; công suất siêu âm, X_2 ; thời gian siêu âm, X_3) đến hàm lượng lutein; ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL và công suất siêu âm (a, d); ảnh hưởng của tỷ lệ DM/NL và thời gian siêu âm (b, e); ảnh hưởng của công suất siêu âm và thời gian siêu âm (c, f).



Hình 6. Mô hình dự đoán hàm lượng lutein

Sau khi nhận được điều kiện trích ly tối ưu, tiến hành lặp lại thí nghiệm thực nghiệm 3 lần ở điều kiện tối ưu thu được, so sánh kết quả thực tế và kết quả dự đoán từ mô hình tối ưu. Kết quả kiểm tra thực nghiệm thu được hàm lượng lutein là 592,95 mg/kg CK, chênh lệch 2,99% (<5%) so với hàm lượng lutein dự đoán từ phương trình hồi quy. Điều này cho thấy hàm lượng lutein thực nghiệm không có sự khác biệt có ý nghĩa so với hàm lượng được dự đoán bằng mô hình hồi quy bậc 2. Như vậy, phương trình bậc 2 được sử dụng phù hợp với thực tế và có giá trị thực tiễn. Một số tác giả cũng đã tiến hành nghiên cứu tối ưu trích ly lutein từ thực vật thu được các kết quả tương tự. Song và cộng sự (2018) đã tiến hành tối ưu hóa điều kiện trích ly lutein từ quả bí đỏ có hỗ trợ siêu âm thu được kết quả tại công suất siêu âm 203 W, thời gian siêu âm 30 phút và tỷ lệ DM/NL là 31 mL/g (v/w), hàm lượng lutein thu được là 237,6 $\mu\text{g/g}$ [29]. Saini và cộng sự (2020) đã tối ưu hóa điều kiện trích ly từ vỏ quýt thu được hàm lượng lutein cao nhất là 29,7 $\mu\text{g/g}$ tại các điều kiện tỷ lệ DM/NL 6,16 mL/g (v/w), nhiệt độ 43,14 $^{\circ}\text{C}$ và thời gian siêu âm 33,71 phút [31].

4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đã chứng minh n-hexan là dung môi phù hợp để trích ly lutein từ lá đinh lăng. Các điều kiện tối ưu cho quá trình trích ly thu nhận lutein được xác định qua hàm lượng lutein bằng phương pháp quang phổ UV-Vis (mg/kg CK). Kết quả cho thấy các điều kiện tối ưu gồm tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 20,16/1 (v/w), công suất siêu âm 249,38 W và thời gian siêu âm 31,6 phút. Với các điều kiện này, hàm lượng lutein thu được cao nhất tương ứng là $592,95 \pm 2,13$ mg/kg CK. Từ đó làm cơ sở để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về hợp chất sinh học này và ứng dụng vào thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn - Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập 1, NXB Khoa học và Kỹ thuật (2006) 793-797.
2. Şahin S. and Şamlı R. - Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* **20** (1) (2013) 595-602.
3. John J., Ziebland S., Yudkin P., Roe L., and Neil H. - Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial, *The Lancet* **359** (9322) (2002) 1969-1974.
4. Granado F., Olmedilla B., and Blanco I. - Nutritional and clinical relevance of lutein in human health, *British Journal of Nutrition* **90** (3) (2003) 487-502.

5. Lin J.H., Lee D.J., and Chang J.S. - Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae, *Bioresource Technology* **184** (2015) 421-428.
6. F. Delgado-Vargas and O. Paredes-López - Enzymatic treatment to enhance carotenoid content in dehydrated marigold flower meal, *Plant Foods for Human Nutrition* **50** (2) (1997) 163-169.
7. Navarrete-Bolaños J.L., Jiménez-Islas H., Botello-Alvarez E., Rico-Martínez R., and Paredes-López O.- Improving xanthophyll extraction from marigold flower using cellulolytic enzymes, *Journal of agricultural food chemistry* **52** (11) (2004) 3394-3398.
8. He R.R., Tsoi B., Lan F., Yao N., Yao X.S., and Kurihara H. - Antioxidant properties of lutein contribute to the protection against lipopolysaccharide-induced uveitis in mice, *Chinese Medicine* **6** (1) (2011) 1-8.
9. Tekwani S. and D'mello P. - Enzyme assisted extraction of lutein from marigold flowers and its evaluation by HPLC, *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* **1** (4) (2010)
10. Delgado-Vargas F. and Paredes-López O. - Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles, *Journal of Agricultural Food Chemistry* **45** (4) (1997) 1097-1102.
11. Li H.B., Jiang Y., and Chen F. - Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (5) (2002) 1070-1072.
12. Deenu A., Naruenartwongsakul S., and Kim S.M.- Optimization and economic evaluation of ultrasound extraction of lutein from *Chlorella vulgaris*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **18** (6) (2013) 1151-1162.
13. Wu Z., Wu S., and Shi X. - Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*, *Journal of Food Process Engineering* **30** (2) (2007) 174-185.
14. Hà Thị Bích Ngọc Ngọc, Trần Thị Huyền Nga, and Nguyễn Văn Mùi - Điều tra hợp chất carotenoid trong một số thực vật của Việt Nam, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* **23** (2007) 130-134.
15. Chemat F. and Khan M.K. - Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry* **18** (4) (2011) 813-835.
16. Vilku K., Mawson R., Simons L., and Bates D. - Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review, *Innovative Food Science Emerging Technologies* **9** (2) (2008) 161-169.
17. Esclapez M., García-Pérez J.V., Mulet A., and Cárcel J. - Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Engineering Reviews* **3** (2) (2011) 108-120.
18. Van den Berg H., Faulks R., Granado H.F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., S. Southon, and Stahl W. - The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects, *Journal of the Science of Food Agriculture* **80** (7) (2000) 880-912.
19. Butnariu M., Sarac I., Pentea M., Samfira I., Negrea A., Motoc M., Buzatu A.R., and Ciopec M. - Approach for analyse stability of lutein from *Tropaeolum majus*, *Revista de Chimie* **67** (3) (2016) 503-506.
20. Hoàng Thị Huệ An, Nguyễn Văn Hòa, and Phan Xuân Minh Tuấn - Ảnh hưởng của một số điều kiện xử lý và bảo quản sau thu hoạch đến sự tồn thất lutein ở hoa cúc vạn thọ (*Tagetes erecta* L.), *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản* **1** (2010) 11-16.

21. Rostagno M.A. and Prado J.M. - Natural product extraction: Principles and applications, Vol .21, RSC Publishing (2013).
22. Amorim-Carrilho K., Cepeda A., Fente C., and Regal P. - Review of methods for analysis of carotenoids, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **56** (2014) 49-73.
23. Taungbodhitham A.K., Jones G.P., Wahlqvist M.L., and Briggs D.R. - Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables, *Food Chemistry* **63** (4) (1998) 577-584.
24. Lê Văn Việt Mẫn - Công nghệ chế biến thực phẩm, NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2011)
25. Ofori-Boateng C. and Lee K. - Response surface optimization of ultrasonic-assisted extraction of carotenoids from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds, *Food Science & Nutrition* **1** (3) (2013) 209-221.
26. Zhang Z.S., Wang L.J., Li D., Jiao S.S., Chen X.D., and Mao Z.H. - Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, *Separation Purification Technology* **62** (1) (2008) 192-198.
27. Charles D.J. - Antioxidant properties of spices, herbs and other sources, Springer New York, USA (2013).
28. Goula A.M., Ververi M., Adamopoulou A., and Kaderides K. - Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils, *Ultrasonics sonochemistry* **34** (2017) 821-830.
29. Song J., Yang Q., Huang W., Xiao Y., Li D., and Liu C. - Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction, *Food Bioproducts Processing* **107** (2018) 104-112.
30. Joglekar A.M., May A. - Chapter 10. Product excellence through experimental design, In: Graf E., and Saguy I. (ed.) - *Food product development: From concept to the marketplace*, Springer Science & Business Media, Berlin, Germany (1987) 211-230.
31. Saini A., Panesar P.S., and Bera M.B. - Valuation of *Citrus reticulata* (kinnow) peel for the extraction of lutein using ultrasonication technique, *Biomass Conversion Biorefinery* **11** (5) (2021) 2157-2165.

ABSTRACT

OPTIMATION ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF LUTEIN FROM *Polyscias fruticosa* (L.) Harms

La Boi Suong, Nguyen Cam Huong, Hoang Thi Ngoc Nhon*

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Email: nhonhtn@fst.edu.vn

This study was conducted to determine the factors affecting the extraction yield of lutein from *Polyscias fruticosa* (L.) Harms's leaves. The investigated factors include type of solvent (methanol, ethanol, n-hexane), solvent/material ratio (10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1 mL/g), ultrasonic power (150, 187.5, 225, 262.5, 300 W) and ultrasonic time (15, 20, 25, 30, 35 min). The extraction efficiency was shown by the content of lutein measured by UV-Vis spectroscopy. Then, the lutein extraction conditions, namely solvent/material ratio, ultrasonic power, and ultrasonic time, were investigated to optimize by using the response surface method. The results showed that at the optimal conditions, the solvent/material ratio was 20.16/1 (v/w), the ultrasonic power was 249.38 W, and the ultrasonic time was 31.6 minutes to obtain the lutein content is 592.95 ± 2.13 mg/kg CK.

Keywords: Extraction, lutein, *Polyscias fruticosa* (L.) Harms, ultrasonic-assisted extraction.