

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

TRẦN Ý ĐOAN TRANG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC,
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC
DỊCH CHIẾT TỪ RỄ CÂY MẬT NHÂN
(*E. LONGIFOLIA*) VÀ ỨNG DỤNG TRONG
CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm và đồ uống

Mã số: 60.54.02

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng - Năm 2014

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. TRƯƠNG THỊ MINH HẠNH**

Phản biện 1: **PGS.TS. ĐẶNG MINH NHẬT**

Phản biện 2: **GS.TSKH. LÊ VĂN HOÀNG**

Luận văn được bảo vệ trước Hội đồng chấm Luận văn thạc sĩ kỹ thuật họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 29 tháng 11 năm 2014

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin - Học liệu, Đại học Đà Nẵng

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong những năm gần đây, nhu cầu tiêu dùng đang có xu hướng sử dụng các sản phẩm thực phẩm cũng như dược phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên. Mật nhân được biết đến là loại thực vật chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học với tác dụng trị bệnh, tăng cường sức khỏe, do đó có thể sử dụng chiết xuất từ loại thảo dược này để làm thực phẩm chức năng – điều này thỏa mãn nhu cầu tiêu dùng hiện đại. Hầu hết các bộ phận của cây mật nhân đều được tác dụng trị bệnh. Các chiết xuất từ mật nhân đã được y học cổ truyền sử dụng để điều trị bệnh sốt rét, làm thuốc tăng trưởng hoocmon sinh dục và làm thuốc hạ nhiệt. Rễ mật nhân được cho là thành phần có giá trị nhất, được sử dụng để điều trị nhiều bệnh như đau nhức, sốt dai dẳng, sốt rét, suy dương, kết ly, sung tuyến và có thể dùng làm thuốc tăng cường sức khỏe. Chiết xuất từ rễ cây mật nhân được dùng để khôi phục lại năng lượng cơ thể và sinh khí, tăng cường lưu thông máu đồng thời có vai trò tốt đối với phụ nữ sau khi sinh con. Ngoài ra, chiết xuất từ rễ mật nhân cũng được báo cáo rằng có chứa các hợp chất có hoạt tính chống khối u, chống ký sinh trùng, có khả năng gây độc tế bào đối với dòng tế bào gây ung thư ở người như ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại tràng và chống loét,... Một hoạt tính rất nổi bật của loại cây này đó là hoạt tính tăng nội tiết tố testosterone ở nam giới; đã có rất nhiều nghiên cứu báo cáo về hoạt tính sinh học này trên chuột cũng như trên cơ thể người. Vì vậy, việc chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng từ rễ cây mật nhân để có thể bổ sung vào thực phẩm, tạo ra sản phẩm mới vừa đảm bảo giá trị dinh dưỡng vừa có tác dụng ngăn ngừa bệnh tật mang lại sức khỏe cho con người là cần thiết.

Hiện nay trên thế giới, công nghệ chiết xuất và ứng dụng các chiết xuất từ mật nhân đã được sử dụng rộng rãi trong cả dược phẩm và thực phẩm. Riêng ở nước ta, mật nhân mới chỉ được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền, chưa có nhiều công trình công bố về vấn đề khai thác và ứng dụng của nó. Với những tác dụng to lớn của loại thảo dược quý này, đồng thời nhằm đa dạng hóa sản phẩm và nâng cao giá trị sử dụng của rễ cây mật nhân chúng tôi đã quyết định chọn đề tài: ***“Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của các dịch chiết từ rễ cây mật nhân (Eurycoma longifolia) và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm”***.

2. Mục đích nghiên cứu

- Xác định một số thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của rễ cây mật nhân.
- Khảo sát chọn dung môi và các điều kiện chiết tốt nhất.
- Nghiên cứu làm giảm vị đắng dịch chiết nước mật nhân.

3. Phạm vi nghiên cứu

Rễ cây mật nhân được thu nhận từ huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Phạm vi nghiên cứu: chiết xuất các thành phần hoạt tính sinh học từ rễ cây mật nhân và định danh thành phần hoá học trong dịch chiết thu được và ứng dụng vào công nghệ thực phẩm.

4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp hóa lý

- Xác định độ ẩm.
- Xác định tro toàn phần.
- Xác định thành phần một số kim loại.
- Xác định thành phần hóa học của dịch chiết: phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS.
- Chiết xuất bằng phương pháp chưng cất.

Phương pháp hóa sinh

- Xác định hàm lượng đường tổng số và hàm lượng tinh bột.
- Xác định hàm lượng protein.
- Xác định hàm lượng lipid.

Phương pháp thử hoạt tính sinh học của dịch chiết

- Hoạt tính chống oxi hóa: phương pháp DPPH.
- Hoạt tính kháng khuẩn : phương pháp đục lỗ.

Phương pháp cảm quan

Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Đóng góp vào kho tài liệu thông tin khoa học về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của cây mật nhân và dịch chiết của nó.
- Đóng góp về các thông số công nghệ của quá trình chiết bằng các phương pháp phân tích khoa học và hiện đại.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Tối ưu hóa điều kiện chiết ở quy mô phòng thí nghiệm; từ đó góp phần ứng dụng đối với quy mô sản xuất.
- Tạo ra sản phẩm mới có giá trị kinh tế, góp phần đa dạng hóa sản phẩm, tăng hiệu quả sử dụng đối với cây mật nhân.
- Góp phần đối với vấn đề nghiên cứu dược liệu ở Việt Nam.

6. Cấu trúc của luận văn

Luận văn gồm 140 trang, ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và các phụ lục còn có các chương sau:

Chương 1: Tổng quan tài liệu, 23 trang.

Chương 2: Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu, 10 trang.

Chương 3: Kết quả và thảo luận, 37 trang.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY MẬT NHÂN

1.1.1. Đặc điểm thực vật và phân bố

Cây mật nhân (còn được gọi với tên bá bệnh, bách bệnh, mật non, hậu phác nam) tên khoa học *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali); là một loại thực vật có hoa thuộc họ *Simaroubaceae* (họ thanh thất) có nguồn gốc từ Đông Nam Á – đặc biệt tìm thấy nhiều ở Malaysia, Indonesia, Thái Lan, Việt Nam, Lào.

1.1.2. Thành phần hóa học

Mật nhân có chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học, mỗi bộ phận của cây chứa thành phần khác nhau như eurycomaoside, eurycolactone, eurycomalactone, eurycomanone, và pasakbumin-B mà trong đó các hợp chất của quassinoid, alkaloid là những thành phần chiếm chủ yếu .

- Quassinoid
- Alkaloid

1.1.3. Hoạt tính sinh học của rễ cây mật nhân

a. Hoạt tính chống sốt rét, gây độc tế bào và hoạt tính chống ung thư

b. Chống bệnh tiểu đường

c. Hoạt tính kích thích tình dục

d. Hoạt tính kháng khuẩn

1.2. CƠ SỞ VỀ CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU

1.2.1. Khái niệm

1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất

a. Những yếu tố thuộc về thành phần, cấu tạo của dược liệu

b. Những yếu tố thuộc về dung môi

c. Những yếu tố thuộc về kỹ thuật

1.2.3. Các phương pháp chiết xuất

a. Phương pháp chiết xuất gián đoạn

b. Phương pháp chiết xuất bán liên tục

c. Phương pháp chiết xuất liên tục

d. Một số kỹ thuật chiết hiện đại

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu

Rễ cây mật nhân được thu nhận từ huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế đem về phòng thí nghiệm để xử lý như sau: rửa sạch, phơi khô tự nhiên, xay nhỏ thành bột, cho vào túi ghép mí để bảo quản.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ và hoá chất trong quá trình nghiên cứu

a. Thiết bị và dụng cụ sử dụng trong quá trình nghiên cứu

b. Hoá chất sử dụng trong quá trình nghiên cứu

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Xác định một số thành phần hoá học của rễ cây mật nhân

a. Phương pháp xác định độ ẩm.

b. Xác định hàm lượng chất béo.

c. Xác định hàm lượng protein

d. Xác định hàm lượng đường tổng số, hàm lượng tinh bột

e. Xác định hàm lượng xenlulozathô

f. Xác định hàm lượng tro tổng số

g. Xác định hàm lượng một số kim loại nặng

2.2.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chưng cất bột rễ mật nhân.

a. Khảo sát lựa chọn dung môi chiết

Khảo sát với 4 dung môi: nước, cồn tuyệt đối, etyl axetat và n-hexan.

b. Khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu đến hiệu suất chiết

Khảo sát 6 tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu 10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1, 60/1.

c. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết

Khảo sát 6 thời gian chiết từ 30, 60, 90, 120, 180 và 240 phút.

d. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu suất chiết.

Khảo sát với các nhiệt độ chiết 60⁰C, 70⁰C, 80⁰C, 90⁰C, 100⁰C.

2.2.3. Khảo sát thành phần hoá học của dịch chiết nước mật nhân bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS

2.2.4. Khảo sát hoạt tính kháng oxi hoá bằng phương pháp DPPH

2.2.5. Phương pháp vi sinh

a. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch

b. Phương pháp xác định tổng vi sinh vật hiếu khí

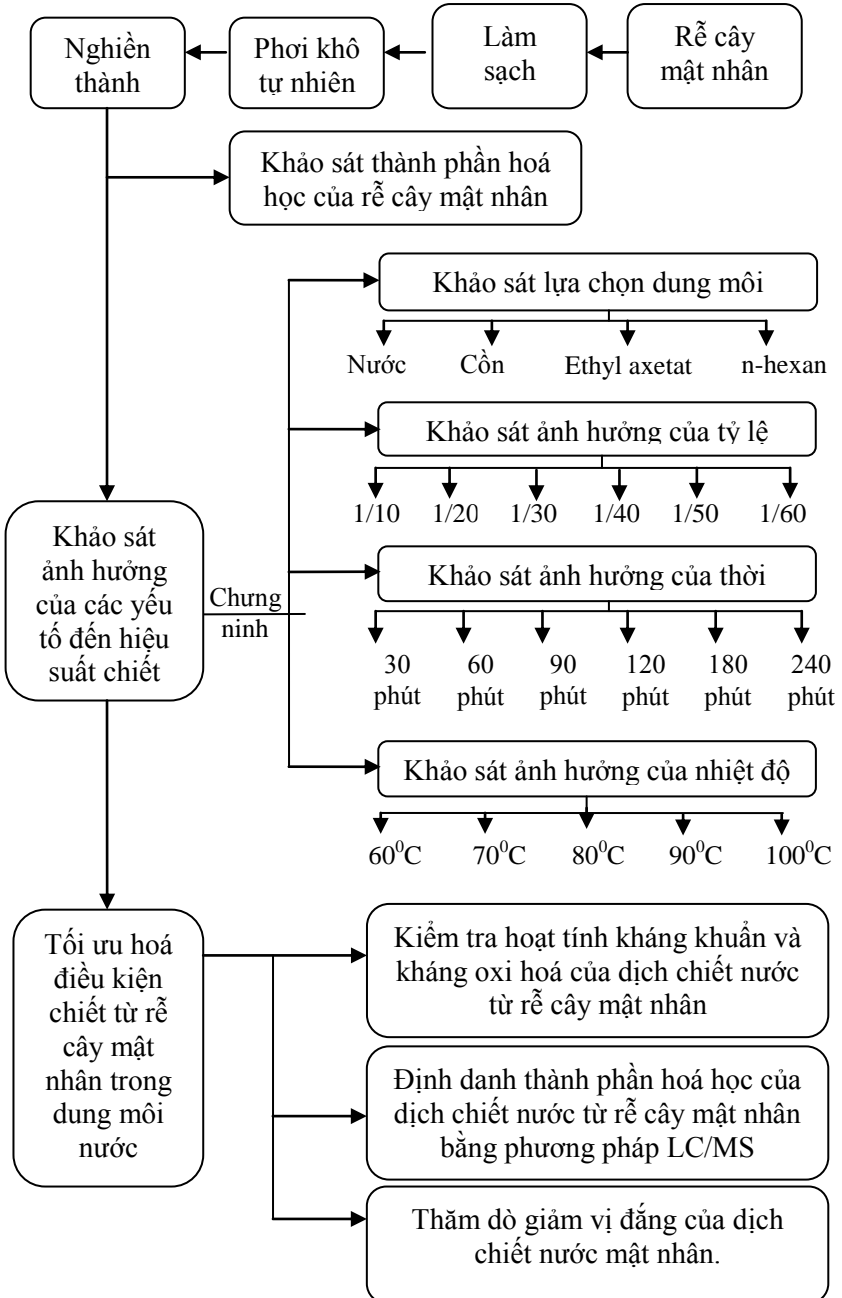
c. Phương pháp xác định tổng số nấm men, nấm mốc

2.2.6. Phương pháp cảm quan

a. Phép thử so hàng mức độ ưu tiên

b. Phép thử thị hiếu chấp nhận

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu



CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA HỌC TRONG RỄ CÂY MẬT NHÂN

Bảng 3.1. Một số thành phần hóa học của rễ cây mật nhân

STT	Tên thành phần	Đơn vị	Hàm lượng
1	Độ ẩm	% KL mẫu	7,43 ± 0,52
2	Chất béo	% KL mẫu	3,26 ± 0,10
3	Protein thô	mg/kg CK	203,2 ± 29,9
4	Tinh bột	% KL mẫu	9,830 ± 0,1
5	Đường tổng	% KL mẫu	0,1795 ± 0,03
6	Chất xơ	% KL mẫu	51,429± 1,137
7	Độ tro	% KL mẫu	1,773± 0,307

Bảng 3.2. Một số kim loại có trong rễ cây mật nhân

STT	Tên thành phần	Đơn vị	Hàm lượng
1	Cr	mg/kg	0,354
2	Ni	mg/kg	0,685
3	Mn	mg/kg	1,472
4	Zn	mg/kg	2,138
5	Fe	mg/kg	2,958
6	Cu	mg/kg	0,956
7	Cd	mg/kg	0,105
8	Pb	mg/kg	0,164
9	AS	mg/kg	0,095
10	Hg	mg/kg	0,075

Kết quả cho thấy, độ ẩm của nguyên liệu đạt 7,43% là tương đối thấp. Với độ ẩm này giúp thuận lợi cho việc bảo quản nguyên liệu trong thời gian dài mà không bị mốc và không bị thay đổi về mặt cảm quan; cũng là điều kiện thuận lợi cho quá trình chiết.

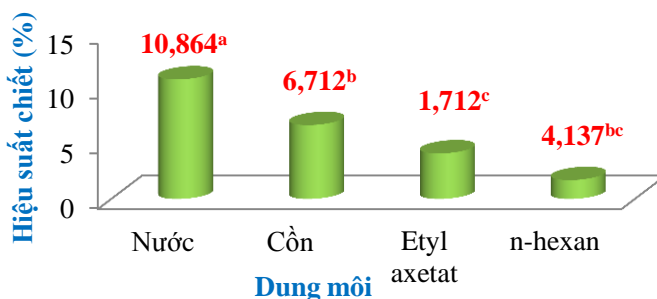
Đối với quá trình chiết xuất, chất béo và protein là thành phần không có lợi, gây cản trở cho quá trình chiết. Trong rễ cây mật nhân, hàm lượng lipid và protein tương đối thấp (lipid chiếm 3,26 % KL

mẫu, protein 203,2 mg/kg), thuận lợi cho việc chiết xuất các thành phần có hoạt tính sinh học.

Hàm lượng của các kim loại nặng phổ biến như Pb, As, Cd, Hg ... thấp hơn nhiều so với hàm lượng kim loại nặng tối đa cho phép có trong thực phẩm theo Bộ Y Tế. Vì vậy có thể sử dụng rễ mật nhân làm nguyên liệu trong thực phẩm mà không ảnh hưởng đến sức khỏe con người.

3.2. NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN DUNG MÔI CHIẾT

Độ phân cực của dung môi khác nhau thì khả năng hòa tan các cấu tử chiết là khác nhau. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn 4 dung môi có độ phân cực tương đối khác nhau để khảo sát là: nước, cồn 96⁰, ethyl axetat và n-hexan.



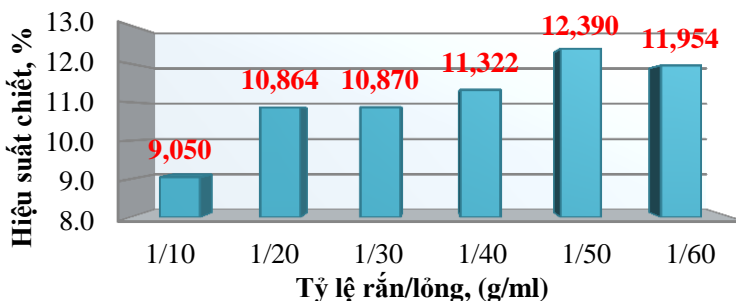
Hình 3.1. Hiệu suất chiết theo từng loại dung môi

Qua đồ thị ta nhận thấy hiệu suất chiết tăng dần theo thứ tự n-hexan, ethyl acetate, ethanol, rồi đến nước. Dung môi được chọn là dung môi phải hòa tan tốt các chất cần chiết. Nguyên tắc dựa vào độ phân cực của dung môi, dung môi càng phân cực thì càng có khả năng hòa tan tốt các hợp chất phân cực, dung môi không phân cực thì có khả năng hòa tan tốt các hợp chất không phân cực. Với 4 dung môi khảo sát thì độ phân cực được xếp theo chiều giảm dần như sau:

nước > cồn > etyl axetat > n-hexan. Kết quả thí nghiệm cho thấy chiều giảm hiệu suất chiết của các dung môi cũng chính là chiều giảm độ phân cực. Có thể giải thích kết quả của hiệu suất chiết như sau: trong thành phần rễ cây mật nhân, theo tác giả Rajeev Bhat và cộng sự (2010) thì thành phần chủ yếu là các quassionoid và alkaloid. Trong đó, các alkaloid là những hợp chất có tính chất phân cực mạnh, còn các quassionoid là những dẫn xuất của triterpend – là những hợp chất phân cực vừa. Do đó, những thành phần này có thể hòa tan tốt trong các dung môi phân cực như nước và cồn, tan tương đối ít trong dung môi etyl axetat, và tan rất ít trong dung môi n-hexan. Mặt khác, nước là một dung môi rẻ tiền, dễ kiếm, an toàn khi bổ sung vào thực phẩm, lại không gây mùi vị khó chịu đối với thực phẩm nên chúng tôi chọn dung môi chiết là nước để thực hiện cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.3 NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU SUẤT CHIẾT TRONG DUNG MÔI NƯỚC

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu



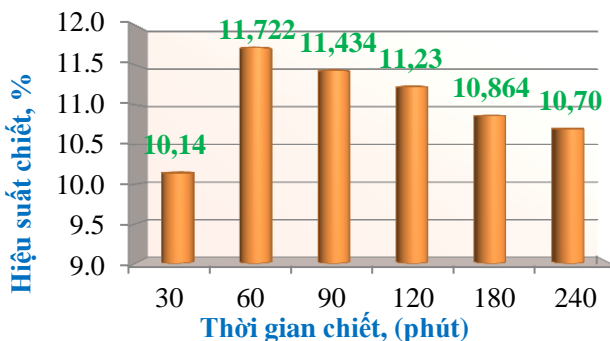
Hình 3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ rắn/lỏng đến hiệu suất chiết

Qua kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ rắn/lỏng, chúng tôi nhận thấy khi thay đổi tỷ lệ từ 1/10 đến 1/50 thì hiệu suất chiết thu được của quá trình chiết tăng lên đáng kể. Tiếp tục giảm tỷ lệ

rắn/lỏng đến 1/60 thì hiệu suất chiết giảm xuống. Như vậy, với tỷ lệ rắn/lỏng khác nhau thì cho hiệu suất chiết khác nhau. Khi tỷ lệ này giảm xuống, tức là cùng với một lượng nguyên liệu nhưng dung môi nhiều hơn do đó bề mặt tiếp xúc của các hạt bột nguyên liệu tăng lên nên khả năng hòa tan các chất chiết tăng theo. Khi tỷ lệ rắn/lỏng lớn, lượng dung môi không đủ để hoà tan hết các cấu tử chiết có trong nguyên liệu, do đó hiệu suất thấp. Khi đạt được mức chiết cao nhất nếu tiếp tục tăng lượng dung môi (giảm tỷ lệ rắn/lỏng) thì khả năng hòa tan các chất chiết sẽ không tăng lên. Mặt khác, khi tăng thể tích dung môi lên còn làm tăng khả năng hòa tan một số tạp chất khác có trong nguyên liệu và gây lãng phí. Vậy tỷ lệ rắn/lỏng tốt nhất ở điều kiện nhiệt độ chiết 80°C , thời gian chiết là 180 phút là 1/50 (g/ml).

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

Trong chiết xuất thường xảy ra một số quá trình: khuếch tán, thẩm thấu, thẩm tích. Do đó thời gian chiết phải thích hợp để cho quá trình chiết có thể lấy triệt để các cấu tử cần thiết ra khỏi nguyên liệu.



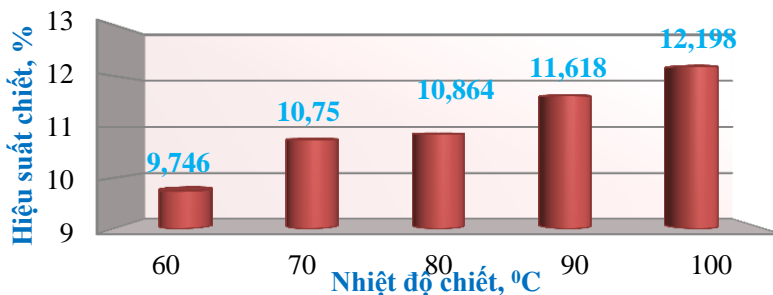
Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết

Kết quả cho thấy rằng, khi tăng thời gian chiết thì hiệu suất chiết tăng lên và đạt cực đại ở 60 phút. Khi bắt đầu chiết, các chất có phân tử lượng nhỏ sẽ được hòa tan và khuếch tán vào dung môi

trước, sau đó mới đến các chất có phân tử lượng lớn. Do đó, ở thời gian 30 phút, một phần các hoạt chất được hòa tan nhưng do thời gian không đủ dài để hòa tan hết các hoạt chất có trong nguyên liệu. Khi tăng thời gian lên 60 phút là thời gian vừa đủ để các cấu tử chiết cần thiết hòa tan triệt để vào dung môi nên hiệu suất tăng lên. Do nước là một dung môi có khả năng hòa tan được rất nhiều chất khác nhau; mặc khác, trong thành phần rễ cây mật nhân có chứa 9,83% tinh bột và một số chất có tính keo; vì vậy khi kéo dài thời gian chiết lên lượng tinh bột này sẽ bị hồ hoá dưới tác dụng của nhiệt trong thời gian dài. Lúc này, độ nhớt của dịch chiết sẽ tăng lên nên gây cản trở cho việc khuếch tán các cấu tử cần chiết từ trong tế bào nguyên liệu ra dung môi. Do đó, hiệu suất chiết khi thời gian tăng lên thì lại giảm đi. Đồng thời, khi kéo dài thời gian chiết, một số cấu tử có trong dịch chiết sẽ bị phân hủy dưới tác động của nhiệt độ sinh ra những hợp chất khác nhau lẫn trong dịch chiết. Vậy, thời gian chung thích hợp ở điều kiện nhiệt độ 80⁰C, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi: 1/20 (g/ml) là 60 phút.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Yếu tố nhiệt độ cũng là yếu tố thường có ảnh hưởng nhiều đến quá trình chiết xuất.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hiệu suất chiết

Với kết quả như trên chúng tôi nhận định rằng khi nhiệt độ càng tăng, tốc độ khuếch tán càng tăng, đồng thời khi nhiệt độ tăng thì độ nhớt của dung dịch càng giảm. Do đó, các cấu tử chiết dễ dàng khuếch tán trong dung môi hơn dẫn đến hiệu suất chiết cao hơn. Ngoài ra, dưới tác dụng của nhiệt độ cao sẽ giúp phá vỡ màng tế bào của nguyên liệu nên góp phần làm cho hiệu suất chiết tăng lên khi chiết ở nhiệt độ cao hơn. Vì vậy, khi tăng nhiệt độ chiết từ 60⁰C đến 100⁰C thì hiệu suất thu được tăng dần và đạt cực đại ở 100⁰C. Vậy, ở điều kiện thời gian là 3 giờ với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 đạt hiệu suất cực đại khi ở nhiệt độ 100⁰C.

KẾT LUẬN CHUNG

Sau khi khảo sát lần lượt 3 yếu tố: tỷ lệ rắn/lỏng, thời gian chiết và nhiệt độ chiết, chúng tôi nhận thấy như sau:

- Đối với nhiệt độ chiết: khi càng tăng nhiệt độ thì hiệu suất chiết càng tăng, do đó chọn điểm nhiệt độ 100⁰C (hiệu suất chiết cao nhất) để khảo sát tối ưu ở phần 3.4 tiếp theo.

- Đối với yếu tố tỷ lệ rắn/lỏng: tỷ lệ rắn/lỏng cho hiệu suất chiết cao nhất ở 80⁰C thời gian 180 phút là 1/50 g/ml.

- Đối với yếu tố thời gian chiết: với tỷ lệ rắn/lỏng 1/20 g/ml và thời nhiệt độ 80⁰C hiệu suất chiết tốt nhất ở thời gian 60 phút.

3.4. NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG ĐỒNG THỜI CỦA TỶ LỆ RẮN/LỎNG VÀ THỜI GIAN CHIẾT ĐẾN HIỆU SUẤT CHIẾT NƯỚC CỦA RỄ CÂY MẬT NHÂN

Sau khi khảo sát riêng lẻ các yếu tố đến hiệu suất chiết rễ cây mật nhân bằng phương pháp chung ninh chúng tôi nhận thấy có sự ảnh hưởng đáng kể của hai yếu tố thời gian và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hiệu suất chiết. Để chọn ra điều kiện chiết tốt nhất cũng như xem xét sự ảnh hưởng đồng thời của các yếu tố đến hiệu suất chiết,

chúng tôi đã chọn quy hoạch thực nghiệm yếu tố toàn phần với 2 yếu tố ảnh hưởng (TYT²).

Từ đó xây dựng điều kiện thí nghiệm theo bảng 3.7 bên dưới.

Bảng 3.7. Điều kiện thí nghiệm được chọn

Các mức	Các yếu tố ảnh hưởng	
	Z ₁ , phút	Z ₂ , g/ml
Mức dưới (-1)	30	1/40
Mức cơ sở (0)	60	1/50
Mức trên (+1)	90	1/60
Khoảng biến thiên	30	1/10

Chọn phương trình hồi qui có dạng:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.1)$$

Trong đó: x₁: thời gian chiết, (phút)

x₂: tỷ lệ dung môi/nguyên liệu, (g/ml)

Tổ chức thí nghiệm và thu được kết quả như bảng 3.8.

Bảng 3.8. Ma trận thực nghiệm TYT² và kết quả thí nghiệm

Số thí nghiệm trong phương án 2 ^k	STT	Biến thực		Biến mã			Hàm mục tiêu Y _u
		Z ₁ , phút	Z ₂ , g/ml	x ₀	x ₁	x ₂	
Số thí nghiệm tại tâm	1	90	1/60	+	+	+	13,048
	2	30	1/60	+	-	+	11,884
	3	90	1/40	+	+	-	11,630
	4	30	1/40	+	-	-	10,710
Số thí nghiệm tại tâm	T ₁	60	1/50	+	0	0	12,886
	T ₂	60	1/50	+	0	0	13,030
	T ₃	60	1/50	+	0	0	13,034

Trong đó:

T₁, T₂, T₃: là thí nghiệm tại tâm phương án

x₀, x₁, x₂ là biến không thứ nguyên

Z₁, Z₂ là biến thực

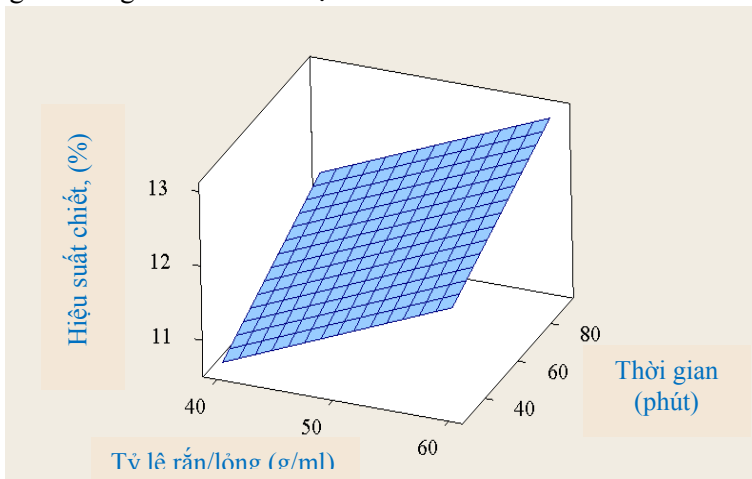
Y_u là hiệu suất chiết, là hàm mục tiêu

Vậy phương trình hồi qui có dạng:

$$Y = 11,818 + 0,521x_1 + 0,648x_2 \quad (1.4)$$

Từ phương trình hồi quy 1.4 ở trên, chúng tôi nhận thấy, giữa hai hệ số $b_1 = 0,521$ và $b_2 = 0,648$, điều đó cho thấy sự ảnh hưởng của yếu tố tỷ lệ rắn/lỏng x_2 đến hiệu suất chiết nhiều hơn so với yếu tố thời gian chiết x_1 . Vì hai hệ số b_1 và b_2 đều là những giá trị dương, do đó nhận thấy khi tỷ lệ rắn/lỏng giảm và thời gian chiết tăng lên sẽ tỷ lệ thuận với chiều tăng của hiệu suất chiết.

Hình 3.5 thể hiện rõ hơn sự ảnh hưởng đồng thời của tỷ lệ rắn/lỏng và thời gian chiết đến hiệu suất chiết



H

Hình 3.5. Sự ảnh hưởng đồng thời của tỷ lệ rắn/lỏng và thời gian chiết đến hiệu suất chiết rễ cây mật nhân trong dung môi nước.

Từ kết quả của các thí nghiệm khi tiến hành quy hoạch thực nghiệm yếu tố toàn phần TYT², chúng tôi lựa chọn điều kiện chưng cất của rễ cây mật nhân trong dung môi nước ở 100°C với tỷ lệ rắn/lỏng là 1/60 (g/ml) trong thời gian 90 phút để thu được hiệu suất chiết cao nhất trong giới hạn nghiên cứu.

3.5. KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HOÁ HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC VÀ TÍNH AN TOÀN THỰC PHẨM CỦA DỊCH CHIẾT TỪ RỄ CÂY MẬT NHÂN TRONG DUNG MÔI NƯỚC

3.5.1. Khảo sát thành phần hoá học của dịch chiết từ rễ cây mật nhân trong dung môi nước

Tiến hành định tính thành phần hoá học có trong dịch chiết nước của rễ cây mật nhân bằng phương pháp LC/MS. Kết quả thể hiện ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. Thành phần hoá học có thể có của dịch chiết nước mật nhân

<i>STT</i>	<i>Thời gian lưu, (phút)</i>	<i>Chế độ chạy</i>	<i>Tên hợp chất</i>	<i>Công thức phân tử</i>
1	2,059	Âm	Chaparrinone (α -methyl)	$C_{20}H_{26}O_7$
2	7,784	Âm	Eurycomanone	$C_{20}H_{24}O_9$
3	12,687	Âm	Eurycomalide	$C_{19}H_{24}O_6$
4	5,250	Dương	3-ethoxy-benzaldehyde	$C_9H_{10}O_2$
5	7,770	Dương	9-methoxycanthin-6-one	$C_{15}H_{10}N_2O_2$
6	12,400	Dương	Canthin-6-one-3N-oxide hoặc 11-hydroxycanthin-6-one	$C_{14}H_8N_2O_2$
7	13,002	Dương	Eurycomanol	$C_{20}H_{26}O_9$
8	15,961	Dương	15 β -O-acetyl-14-hydroxyklaineanon hoặc 6 α -acetoxy-15 β -hydroxyklaineanon	$C_{22}H_{30}O_9$
	16,289	Dương	13 β ,18-dihydroeurycomanol hoặc 5 α ,14 β ,15 β -trihydroklaineanon	$C_{20}H_{28}O_9$

Trong đó, chaparrinone (α -methyl) đã được báo cáo là một quassinoid có hoạt tính chống khối u trên chuột và đã thử nghiệm

hoạt tính chống khối u này trên tế bào cơ thể người. Eurycomanone là một trong những quassinoid chính của rễ cây mật nhân; có khả năng làm tăng nội tiết tố testosterone và lượng tinh dịch ở chuột đực, có tác dụng chống lại estrogen trong cơ thể chuột trưởng thành. Theo công bố vào năm 2008, eurycomanone còn có khả năng gây độc tế bào đối với các tế bào ung thư, có khả năng gây độc tế bào đối với dòng tế bào gây ung thư phổi A549, dòng tế bào KB và có hoạt tính chống sốt rét khá mạnh. Hợp chất eurycomalide là một trong những thành phần hoạt tính sinh học đặc trưng có trong rễ cây mật nhân. 3-ethoxy-benzaldehyde đã được tìm thấy trong chiết xuất cồn của rễ cây mật nhân của tác giả Anisa Rahmalia. 9-methoxycanthin-6-one là một trong những alkaloid có trong thành phần rễ cây mật nhân có hoạt tính gây độc mạnh đối với dòng tế bào gây ung thư phổi A549 và dòng tế bào gây ung thư vú MCF-7. Canthin-6-one-3N-oxide đã được chứng minh có hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào gây ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại tràng. Eurycomanol là một quassinoid có hoạt tính chống ký sinh trùng sốt rét và có khả năng tăng nội tiết tố ở nam giới. 6 α -acetoxy-15 β -hydroxyklaineanone và 15 β -O-acetyl-14-hydroxyklaineanone đều đã được tìm thấy trong rễ cây mật nhân. Trong đó, 6 α -acetoxy-15 β -hydroxyklaineanone có hoạt tính gây độc tế bào chống lại dòng tế bào gây ung thư P388; còn 15 β -O-acetyl-14-hydroxyklaineanone là một quassinoid có hoạt tính chống khối u, chống sản ký sinh trong máu và có khả năng chống ký sinh trùng sốt rét. 13 β ,18-dihydroeurycomanol có thể kháng lại ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*.

3.5.2. Khảo sát một số hoạt tính sinh học của dịch chiết

Cùng với sự phát triển của dược phẩm, thì thực phẩm có hoạt tính sinh học cũng ngày càng phát triển theo. Với sự đa dạng về sản

phẩm như hiện nay, một sản phẩm đáp ứng được nhiều chức năng khác nhau luôn được người tiêu dùng chấp nhận.

a. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá bằng phương pháp DPPH

Bảng 3.11. Kết quả thử hoạt tính kháng oxy hoá DPPH

STT	Ký hiệu mẫu	EC ₅₀ (µg/ml)
1	Dịch chiết nước rễ cây mật nhân	>128
Tham khảo	Resveratrol	8,3

Từ kết quả kiểm tra hoạt tính ở trên, nhận thấy rằng, dịch chiết trong nước của rễ cây mật nhân chỉ có khả năng kháng oxy hoá ở nồng độ > 128 µg/ml. Còn đối với mẫu chuẩn là resveratrol thì khả năng kháng oxy hoá ở 8,3 µg/ml. Theo tác giả Lê Thị Lý và Trần Văn Khôi thì dịch chiết thô của rễ mật nhân trong dung môi methanol: chloroform có chỉ số IC₅₀ là 97,381 µg/ml, và được nhận xét là có hoạt tính chống oxy hoá yếu. Cũng nghiên cứu về hoạt tính kháng oxy hoá, tác giả Purwantiningsih và cộng sự (năm 2011) cũng đã báo cáo cao khô từ rễ cây mật nhân trong cồn có hoạt tính kháng gốc DPPH thấp, với chỉ số EC₅₀ đạt 754 µg/ml. Cùng là chiết xuất trong cồn (70%) của rễ cây mật nhân nhưng tác giả C.P. Varghese và cộng sự (năm 2012) đã báo cáo, hoạt tính kháng oxy hoá của chiết xuất ethanol có EC₅₀ là 169.56 µg/ml và đã nhận định chiết xuất cồn của rễ cây mật nhân sở hữu tính kháng oxy hoá. Từ kết quả nhận được từ viện hoá học đồng thời so sánh với các kết quả của những nghiên cứu đi trước ở nước ngoài, chúng tôi nhận thấy chiết xuất trong nước của rễ cây mật nhân không có tính kháng oxy hoá. Kết quả này có thể do dịch chiết sử dụng là dịch chiết thô nên có thể làm giảm hoạt lực của dịch chiết. Do đó, kết quả thử hoạt tính kháng oxy hoá đối với dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân là không thành công.

b. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Vi sinh vật kiểm tra *E. Coli* và *Staphylococcus aureus*.

Môi trường nuôi cấy LB.

Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn

Vi khuẩn	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
Dịch chiết mật nhân, mm	0	0
Đối chứng (nước cất), mm	0	0

Kết quả cho thấy, dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân không có khả năng kháng khuẩn đối với *E. Coli* và *St. aureus*. Với kết quả này đã được giải thích có thể là do thí nghiệm này chỉ sử dụng chiết xuất thô chưa qua bước phân lập các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn chứa trong thành phần nguyên liệu; do đó, làm giảm đi hoạt tính sinh học của dịch chiết thu được một cách đáng kể. Đồng thời, việc lựa chọn vi khuẩn để tiến hành thí nghiệm chỉ trên 2 chủng *E. Coli* và *St. aureus*; do đó chưa thể nào thể hiện được khả năng kháng khuẩn của dịch chiết đối với các chủng vi khuẩn khác. Lý do thứ ba theo chúng tôi nhận thấy, thí nghiệm này không thành công có thể là do nồng độ dịch chiết quá loãng (1/60 g/ml).

3.5.3. Thăm dò tính an toàn thực phẩm của dịch chiết

Tính an toàn trong thực phẩm luôn là một mối quan tâm của nhiều người tiêu dùng.

Bảng 3.13. Kết quả thăm dò tính an toàn thực phẩm của dịch chiết

STT	Chỉ tiêu vi sinh	Kết quả
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Không phát hiện
2	Tổng số nấm men – nấm mốc	Không phát hiện
3	Hàm lượng kim loại nặng	Nằm trong giới hạn cho phép của bộ y tế

Với những kết quả khảo sát trên đây, nhận thấy rằng chiết xuất từ nước của rễ cây mật nhân có chứa nhiều hợp chất có khả năng trị bệnh cũng như mang hoạt tính sinh học quý. Hơn nữa, dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân được đảm bảo tính an toàn về hàm lượng kim loại nặng, chỉ tiêu vi sinh (tổng số vi khuẩn hiếu khí, tổng số nấm men – nấm mốc). Vì vậy, có thể sử dụng dịch chiết này để bổ sung vào thực phẩm.

3.6. ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM VÀ ĐỀ XUẤT QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Mật nhân được biết đến bởi nhiều công dụng chữa bệnh ở trong các bài thuốc dân gian, nhưng chiết xuất của loại thảo dược này cũng được biết đến bởi vị đắng gắt của nó. Theo nhiều người đã sử dụng cho biết thì dịch chiết của rễ mật nhân tương đối khó uống. Do đó, để giảm tính đắng vốn có của cây thuốc này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm bổ sung vào cafe với mục đích giảm vị đắng đến mức chấp nhận được.

3.6.1. Nghiên cứu khảo sát tỷ lệ bổ sung dịch chiết mật nhân vào sản phẩm cafe

a. Đánh giá cảm quan sơ bộ

Kết quả đánh giá cảm quan sơ bộ cho thấy mẫu cafe có bổ sung mật nhân được đánh giá vẫn giữ được mùi thơm và hương vị như mẫu cafe không có bổ sung, đa số người thử đều chấp nhận được vị đắng của mẫu cafe mật nhân và nhận xét không có sự khác nhau về vị đắng của hai mẫu cafe mặc dù hậu vị của mẫu này đắng hơn so với mẫu cafe không bổ sung.

b. Khảo sát tỷ lệ dịch chiết mật nhân bổ sung thích hợp

Phép thử sử dụng: phép thử so hàng mức độ ưu tiên.

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá cảm quan lần 1

STT	Mẫu cafe	Tổng hạng	Nhóm ý nghĩa
1	Mẫu 1	61	a
2	Mẫu 2	74	a
3	Mẫu 3	69	a

Như vậy, đối với kết quả của cuộc đánh giá cảm quan này chúng tôi thấy rằng 3 tỷ lệ bổ sung không khác nhau có ý nghĩa; nhưng trong đó mẫu 1 có tổng hạng thấp nhất nên sẽ được ưu tiên hơn mẫu 2 và mẫu 3. Vậy, kết quả đánh giá cảm quan của phép thử so hàng mức độ ưu tiên lựa chọn tỷ lệ dịch cafe/dịch chiết mật nhân là 50/50.

c. Đánh giá chất lượng cafe có tỷ lệ bổ sung dịch chiết mật nhân thích hợp

Để đánh giá chất lượng của mẫu cafe được lựa chọn thông qua phép thử thị hiếu chấp nhận của người tiêu dùng.

Bảng 3.16. Kết quả tổng hợp của phép thử thị hiếu chấp nhận

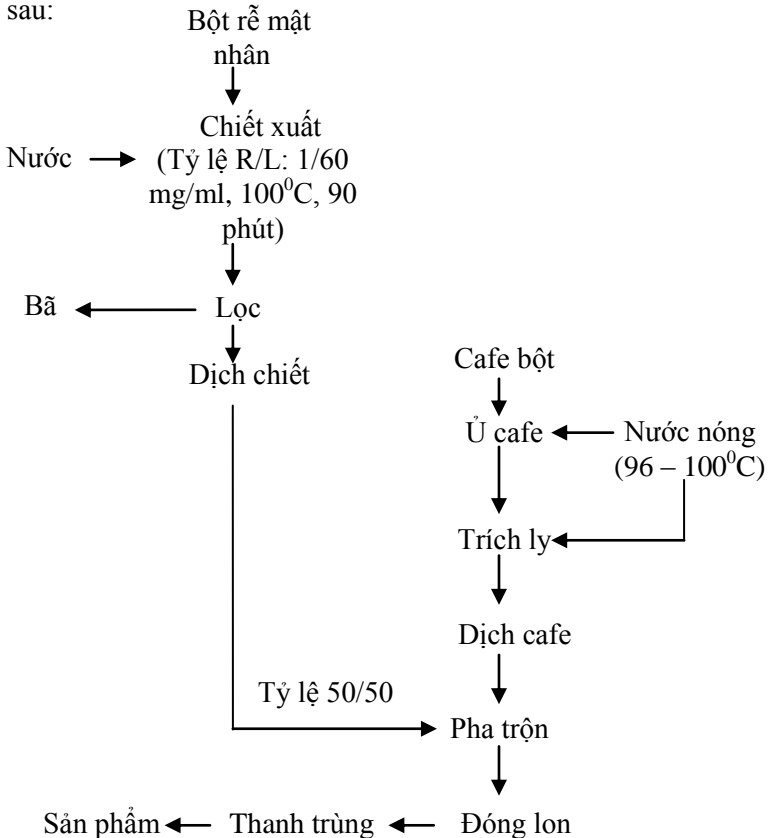
Mẫu cafe	Mẫu 1 (cafe bổ sung dịch chiết mật nhân)	Mẫu 2 (cafe không bổ sung dịch chiết mật nhân)
Tổng điểm	327	356
Điểm thị hiếu trung bình	$6,76 \pm 1,333$	$7,12 \pm 1,350$
So sánh 2 trung bình, P	0,183	

Từ các kết quả thu được ở bảng 3.16 chúng tôi nhận thấy hai mẫu cafe dù có bổ sung hay không bổ sung dịch chiết mật nhân thì điểm trung bình thị hiếu tương đương nhau. Đồng thời sử dụng phần mềm minitab để so sánh điểm thị hiếu trung bình của 2 mẫu cafe nêu trên ở mức ý nghĩa $\alpha = 1\%$ bằng phép kiểm định t-student cho hai mẫu, thu được giá trị $P = 0,183 > 0,01$. Điều này có nghĩa: ở mức ý

ngiã $\alpha = 1\%$, điẽm thị hiẽu trung bình của cafe có bổ sung dịch chiết mật nhân không khác điẽm thị hiẽu trung bình của cafe không có bổ sung. Từ nhữg khảo sát thăm dò ở trên, nhận thấy rằng việc bổ sung dịch chiết mật nhân vào sản phẩm cafe có ý nghĩa trong việc làm giảm vị đắng của dịch chiết nguyên chất một cách đáng kể.

3.6.2. Đề xuất quy trình sản xuất cafe với dịch chiết mật nhân

Với khả năng tiện lợi, không tốn thời gian pha chế, chúng tôi lựa chọn sản phẩm cafe uống liền để đưa ra quy trình sản xuất ở phòng thí nghiệm. Thông qua nhữg đánh giá và khảo sát ở phần trên, chúng tôi đề xuất quy trình sản xuất cafe mật nhân uống liền như sau:



KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đưa ra một số kết luận chính như sau:

1. Đã xác định một số thành phần hoá học của rễ cây mật nhân thu nhận từ huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế

2. Khảo sát quá trình chiết xuất mật nhân bằng phương pháp chưng cất:

- Trong 4 loại dung môi: n-hexan, etyl axetat, cồn 96⁰ và nước; hiệu suất chiết từ nước đạt cao nhất.

- Quá trình khảo sát ảnh hưởng đơn biến của các yếu tố: tỷ lệ rắn/lỏng, thời gian chiết và nhiệt độ chiết cho thấy ở nhiệt độ 100⁰C; tỷ lệ rắn/lỏng 1/50 g/ml và thời gian chiết 60 phút cho hiệu suất chiết tốt nhất.

- Nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời hai yếu tố tỷ lệ rắn/lỏng và thời gian chiết ở nhiệt độ 100⁰C cho thấy hiệu suất chiết cao nhất khi ở 1/60 g/ml trong 90 phút.

3. Một số cấu tử có trong dịch chiết nước của rễ cây mật nhân được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS gồm có: chaparrinone (α -methyl), eurycomanone, eurycomalide, 3-ethoxy-benzaldehyde, 9-methoxycanthin-6-one, canthin-6-one-3N-oxide, 11-hydroxycanthin-6-one, eurycomanol, 6 α -acetoxy-15 β -hydroxyklaineaneone, 15 β -O-acetyl-14-hydroxyklaineaneone, 13 β ,18-dihydroeurycomanol và 5 α ,14 β ,15 β -trihydroklaineaneone với khả năng chống khối u, chống ung thư, chống sốt rét và có hoạt tính tăng cường sinh lý ở nam giới.

4. Khảo sát hoạt tính sinh học của dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân cho kết quả như sau:

- Dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân có khả năng kháng oxi

hoá nhưng hoạt lực tương đối yếu.

- Dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân hoàn toàn không có khả năng kháng *E.coli* và *Staphylococcus aureus*.

5. Dịch chiết nước từ rễ cây mật nhân đảm bảo tính an toàn thực phẩm về chỉ tiêu hàm lượng kim loại nặng, tổng số nấm mốc – nấm men, tổng số vi sinh vật hiếu khí.

6. Tiến hành thăm dò giảm vị đắng của dịch chiết cho thấy tỷ lệ dịch cafe/dịch chiết mật nhân ở mức 50/50 được đánh giá yêu thích nhất và có vị đắng chấp nhận được.

KIẾN NGHỊ

Sau quá trình nghiên cứu, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị sau đây:

- Để chiết tách các cấu tử có hoạt tính sinh học với hiệu suất cao hơn, cần tiếp tục nghiên cứu chiết xuất trong dung môi nước nhưng ở điều kiện có áp suất hoặc những phương pháp chiết chân không hoặc chiết siêu âm.

- Thành phần chính của rễ cây mật nhân là các quassinoid cần được phân lập bằng các dung môi hữu cơ khác để cho hoạt lực mạnh hơn.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố pH, yếu tố độ mịn của bột nguyên liệu đến hiệu suất chiết đối với phương pháp chung ninh trong dung môi nước.

- Tiến hành định danh thành phần hoá học của dịch chiết mật nhân thu được bằng phương pháp LC/MS/MS để thu được kết quả chính xác hơn.