

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM CHỐNG OXY HÓA TỰ NHIÊN TỪ LÁ CHÈ GIÀ

ĐẶNG MINH NHẬT

1. GIỚI THIỆU

Cây chè có tên khoa học là *Camellia sinensis* L. được trồng phổ biến ở nước ta và một số nước trên thế giới. Lợi ích sinh học của cây chè đã được biết đến từ lâu như khả năng kháng khuẩn, ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào ung thư, giảm huyết áp, giảm mệt mỏi và căng thẳng, hạn chế quá trình lão hóa, ngăn ngừa nguy cơ các bệnh về tim mạch..., trong đó hoạt tính chống oxy hóa của nó đã được quan tâm nhiều trong công nghiệp thực phẩm gần đây, khi xuất hiện tâm lí ngại sử dụng những sản phẩm có bổ sung hóa chất tổng hợp của người tiêu dùng và những báo cáo về khả năng gây ung thư của những phụ gia chống oxy hóa tổng hợp phổ biến như BHA, BHT, TBHQ. Nhu cầu về các hoạt chất chống oxy hóa tự nhiên trở nên cấp thiết. Nhiều nghiên cứu đã xác nhận khả năng chống oxy hóa của các loại chè thương phẩm như chè xanh, chè đen, chè oolong. Hoạt tính này được cho là do sự có mặt của các hợp chất catechin trong chè, nhất là Epigallocatechin Galate (EGCG). Đây là thành phần polyphenol có hàm lượng cao nhất và hoạt tính mạnh nhất [1 - 6].

Cây chè được trồng phổ biến ở nước ta từ Bắc đến Nam. Thường chỉ có búp và lá non được chế biến thành thương phẩm, lá chè già ít được sử dụng. Ở khu vực vùng ven Đà Nẵng, cây chè cũng được trồng để nấu nước uống, không được chế biến thành chè thương phẩm vì phẩm chất không cạnh tranh với các loại chè phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu một số tác giả cho thấy lá chè già vẫn có thể là nguồn cung cấp chất chống oxy hóa đáng kể. Ngoài ra, thành phần polyphenol chiết được từ lá chè phụ thuộc rất nhiều vào nguồn gốc chè, thổ nhưỡng, khí hậu, phương pháp chiết... [7 - 11].

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá khả năng khai thác lá chè già tạo ra chế phẩm chống oxy hóa tự nhiên thông qua các nghiên cứu xác định điều kiện chiết và thu hồi chế phẩm có hoạt tính tốt nhất.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Lá chè sử dụng trong nghiên cứu được thu hái tại vườn chè ở xã Hòa Minh, huyện Hòa Vang, Đà Nẵng. Loại chè này thường được dùng nấu uống, tuy nhiên chất lượng được cho là không bằng các loại chè thương phẩm trên thị trường như chè Thái Nguyên hay chè Lâm Đồng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết hoạt chất chống oxy hóa từ lá chè già

Nguyên liệu được hái từ cây chè, loại bỏ búp và lá non, rửa sạch, sau đó hấp để vô hoạt enzim, độ ẩm nguyên liệu sau khi hấp được xác định là 64,0%.

Cân 5,56 g lá chè hấp (tương ứng 2,00 g chất khô) vào bình chưng cất có chứa một thể tích nước theo tỉ lệ nước: chất khô xác định. Lắp ống sinh hàn và ninh chưng ở nhiệt độ cài đặt trong bể ổn nhiệt với thời gian định trước. Sau mỗi lần chiết, hỗn hợp chiết được định mức trong bình định mức 250 ml, lọc dịch chiết và đem đi đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH và xác định hàm lượng EGCG bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2.2.2. Xác định độ ẩm của lá chè và chế phẩm

Sử dụng máy phân tích ẩm nhanh Sartorius (Đức).

2.2.3. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Khả năng chống oxy hóa của các chiết xuất được đánh giá thông qua khả năng trung hòa gốc tự do theo phương pháp được mô tả bởi Min-Jer Lu và cộng sự [12]. Nguyên tắc của phương pháp dựa vào khả năng các chất chống oxy hóa chuyển hóa gốc tự do 1,1-diphenyl 2-picryl hydrazyl thành sản phẩm phân tử làm cho dung dịch chuyển từ màu tím sang vàng. Tiến hành như sau: Dịch chiết được pha loãng ở các nồng độ khác nhau. Lấy 1 ml của dịch chiết cho vào ống nghiệm trong đó có chứa 1 ml dung dịch DPPH 0,1 mM trong methanol (DPPH p.a được mua từ hãng Sigma, Mỹ và methanol p.a mua từ hãng Merck, Đức). Vortex hỗn hợp và ủ 40 phút trước khi đo độ hấp thụ quang ở 517 nm bằng quang phổ kế Biorad. Methanol dùng thay cho dịch chiết để chuẩn bị mẫu trắng. Từ kết quả đo được xác định khả năng ức chế gốc tự do IC theo công thức sau:

$$IC = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100(\%)$$

trong đó, A_{blank} : độ hấp thụ quang của mẫu trắng và A_{sample} : độ hấp thụ quang của mẫu dịch chiết. Từ giá trị IC của các dung dịch có nồng độ pha loãng khác nhau, chúng tôi dùng phương pháp nội suy để tính giá trị IC_{50} tức là nồng độ dịch chiết tại đó khả năng ức chế gốc tự do DPPH (IC) bằng 50%.

2.2.4. Xác định hàm lượng Epigallocatechin Galate (EGCG) bằng phương pháp HPLC [13]

Hàm lượng EGCG trong các dịch chiết chè được định lượng bằng phương pháp HPLC với các điều kiện như sau: Hệ thống HPLC của hãng Waters, Mỹ, sử dụng cột C18 (250 × 4 mm; 10 μm), bước sóng đo của detector UV-VIS là 256 nm, thể tích nạp mẫu 10 μl, pha động là hệ dung môi acetonitrile : nước: acid phosphoric theo tỉ lệ thể tích 11,5 : 88,5 : 0,1.

Chất chuẩn EGCG mua từ hãng Sigma (Mỹ) với hàm lượng tối thiểu 98% được sử dụng để pha dãy các dung dịch chuẩn. Kết quả phân tích các dung dịch chuẩn cho phương trình đường chuẩn $C_{EGCG} (M) = 0,0006 \times \text{chiều cao pic} + 5 \times 10^{-7}$ với hệ số tương quan $R^2 = 1,00$.

2.2.5. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm [14]

Để xác định điều kiện chiết tối ưu chúng tôi sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm với kế hoạch thực nghiệm trực giao bậc 2, sử dụng phần mềm MS Excel để xử lý kết quả.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định thời gian hấp để vô hoạt enzym

Lá chè có chứa các enzym polyphenoloxylase xúc tác quá trình oxy hóa các hợp chất polyphenol, nếu không vô hoạt, hoạt tính của chế phẩm thu được sẽ bị giảm. Có thể vô hoạt enzym này theo nhiều cách khác nhau. Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn phương pháp hấp, vì ít gây tổn hao chất khô hơn so với phương pháp chần.

Tiến hành thí nghiệm xác định thời gian hấp như sau:

Chuẩn bị 3 mẫu lá chè già và mang đi hấp với thời gian lần lượt là 15 giây, 30 giây, 45 giây. Thời gian hấp được tính từ lúc cho lá chè vào vỉ hấp được đặt trên nồi nước đang sôi. Mỗi mẫu chè sau khi hấp được đem đi chiết chất chống oxy hóa theo phương pháp mô tả ở trên. Tất cả các dung dịch sau khi chiết đều có màu vàng rất nhạt, sáng, trong suốt. Để hơ ba mẫu dịch thu được ngoài không khí ở điều kiện nhiệt độ phòng. Kết quả sau 24h mẫu hấp 30 giây có màu thay đổi từ vàng nhạt thành vàng nâu, trong khi các mẫu hấp trong 30 giây và 45 giây đều giữ được màu sắc ban đầu. Điều này chứng tỏ thời gian cần thiết để vô hoạt enzym tối thiểu là 30 giây.

3.2. Đánh giá sơ bộ khả năng chiết hoạt chất chống oxy hóa và EGCG của nước và ethanol

Để chiết các hoạt chất chống oxy hóa từ lá chè, nhiều loại dung môi khác nhau đã được nghiên cứu như methanol, ethanol, nước, acetone, acetonitril, trong số đó nước và ethanol đã chứng tỏ khả năng chiết tốt, hơn nữa đây là những dung môi an toàn, cho phép sử dụng trong chế biến thực phẩm, nên chúng tôi chọn chúng là đối tượng nghiên cứu. Để đánh giá sơ bộ khả năng chiết của chúng, chúng tôi tiến hành như sau:

Mẫu chè xanh sau khi hấp 30 giây, đem đi chiết theo phương pháp trình bày ở phần 2.2.1 với 2 loại dung môi là nước và ethanol 70° trong cùng điều kiện nhiệt độ 80 °C, thời gian 20 phút, tỉ lệ dung môi: nguyên liệu 40 ml/g. Một phần dịch chiết được mang đi xác định hàm lượng EGCG bằng phương pháp HPLC, phần còn lại được đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa của các dịch chiết chè

Dung môi chiết	Hàm lượng EGCG (mM)	Hoạt tính chống oxy hóa (%)
Nước	0,508	52,79
Ethanol	0,961	72,18

Kết quả trên cho thấy cả hai dung môi sử dụng đều có khả năng chiết tốt hoạt chất chống oxy hóa và EGCG. Hàm lượng EGCG chiết được tính theo phần trăm chất khô của lá chè với dung môi nước và ethanol lần lượt là 2,91% và 5,51%. So sánh với hàm lượng EGCG trong búp chè dao động khoảng 8 - 12%, hàm lượng EGCG thu được từ lá chè già cũng đáng kể, mặc dù đây chưa phải là điều kiện chiết tối ưu.

Kết quả này rất có ý nghĩa, cho thấy hoàn toàn có thể sử dụng nguồn lá chè già tại địa phương để khai thác làm nguồn cung cấp chất chống oxy hóa và EGCG dùng trong công nghiệp thực phẩm để bảo quản hoặc làm thực phẩm chức năng. Cây chè tại vùng Quảng Nam - Đà Nẵng

và nhiều khu vực khác của Miền Trung không có chất lượng tốt để sản xuất các sản phẩm chè thương phẩm làm đồ uống như chè Đà Lạt hoặc chè Thái Nguyên. Do đó, nếu được khai thác theo hướng mới này sẽ góp phần làm tăng giá trị sử dụng của cây chè.

Trong nghiên cứu của B.B. Borse và cộng sự, các tác giả cũng nghiên cứu hoạt tính trung hòa gốc tự do của hỗn hợp cả lá chè non và lá chè già trồng ở Ấn Độ bằng phương pháp DPPH và theo dõi thành phần catechin chiết được bằng phương pháp HPLC. Kết quả cũng khẳng định hàm lượng cao của các hợp chất catechin trong dịch chiết và khả năng trung hòa gốc tự do tốt của nó, hoạt tính này đạt hơn 90% so với hoạt tính của lá chè non [15].

3.3. Tối ưu hóa điều kiện chiết tách chất chống oxy hóa với dung môi ethanol

Khả năng chiết hoạt chất chống oxy hóa của ethanol chủ yếu phụ thuộc vào các yếu tố: nồng độ ethanol, nhiệt độ, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi và nguyên liệu. Đối với tỉ lệ dung môi và nguyên liệu, tỉ lệ này càng cao khả năng chiết càng lớn, tuy nhiên quá một giới hạn nhất định ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi và nguyên liệu sẽ không đáng kể, hơn nữa sử dụng tỉ lệ dung môi quá lớn sẽ làm tăng chi phí thu chế phẩm cuối. Kết quả một số nghiên cứu cho thấy tỉ lệ giữa thể tích dung môi và khối lượng chất khô để chiết chất chống oxy hóa tốt nhất là 20 ml/g [16], do đó chúng tôi cố định yếu tố này. Để đánh giá ảnh hưởng của các biến nhiệt độ Z_1 ($^{\circ}\text{C}$), độ rượu Z_2 (%) thể tích EtOH) và thời gian chiết Z_3 (phút) đến hiệu suất chiết, chúng tôi sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm với kế hoạch bậc hai trực giao. Hai hàm mục tiêu được theo dõi ở đây là nồng độ EGCG y_1 (mM) và hoạt tính chống oxy hóa y_2 (%) của dịch chiết thu được. EGCG là thành phần polyphenol chính có trong lá chè và cũng có hoạt tính mạnh nhất trong nhóm catechin nên chúng tôi chọn theo dõi để đánh giá hiệu suất chiết song song với hoạt tính chống oxy hóa. Nồng độ EGCG trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC và hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá bằng Khả năng ức chế gốc tự do IC (%) theo phương pháp DPPH.

Phương trình hồi quy mô tả các mối quan hệ: $y_1 = f(Z_1, Z_2, Z_3)$ và $y_2 = f(Z_1, Z_2, Z_3)$ sau khi chuyển sang biến mã tương ứng x_1, x_2, x_3 sẽ có dạng: $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$

Trên cơ sở các thí nghiệm sơ bộ cùng tham khảo tài liệu, chúng tôi chọn các mức nghiên cứu của các yếu tố như ở bảng 2.

Bảng 2. Các mức nghiên cứu của các yếu tố khảo sát

Yếu tố	+ α	Mức trên	Mức cơ sở	Mức dưới	- α	Khoảng biến thiên (λ)
		+1	0	-1		
$Z_1, ^{\circ}\text{C}$	82,2	80	70	60	57,9	10
$Z_2, ^{\circ}\text{EtOH}$	82,2	80	70	60	57,9	10
$Z_3, \text{phút}$	32,2	30	20	10	7,9	10

Các biến mã x_i và biến thực Z_i có quan hệ như sau: $Z_i = Z_i^0 + \lambda X_i$, trong đó Z_i^0 là giá trị ở mức cơ sở và λ là khoảng biến thiên.

Tổ chức và thực hiện 17 thí nghiệm theo ma trận bảng 3 và kết quả thực nghiệm cũng được thể hiện trên bảng này.

Bảng 3. Mô hình và kết quả thực nghiệm

Số TN	Biến thực			Biến mã			y ₁ (mM)	y ₂ (%)
	Z ₁ (°C)	Z ₂ (%v EtOH)	Z ₃ (phút)	x ₁	x ₂	x ₃		
1	80	80	30	+1	+1	+1	1,102	72,22
2	60	80	30	-1	+1	+1	1,030	68,41
3	80	60	30	+1	-1	+1	1,079	71,3
4	60	60	30	-1	-1	+1	1,021	67,71
5	80	80	10	+1	+1	-1	1,034	69,44
6	60	80	10	-1	+1	-1	0,956	65,63
7	80	60	10	+1	-1	-1	0,952	64,93
8	60	60	10	-1	-1	-1	0,912	61,46
9	82,2	70	20	1,215	0	0	1,052	70,83
10	57,9	70	20	-1,215	0	0	0,945	64,47
11	70	82,2	20	0	1,215	0	1,040	69,79
12	70	57,9	20	0	-1,215	0	0,968	66,32
13	70	70	32,2	0	0	1,215	1,079	70,25
14	70	70	7,9	0	0	-1,215	0,987	66,83
15	70	70	20	0	0	0	1,015	67,36
16	70	70	20	0	0	0	1,020	67,59
17	80	80	30	0	0	0	1,102	72,22

Kết quả trên cho thấy cả ba yếu tố nhiệt độ, nồng độ ethanol, thời gian đều ảnh hưởng đến hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết thu được.

Đối với quá trình chiết bằng ethanol, dịch chiết nào có hàm lượng EGCG cao hơn sẽ có hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Phương trình hồi quy thể hiện mối quan hệ giữa hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa có dạng $y_2 = 50,97 y_1 + 16,14$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,942$. Kết quả này khẳng định EGCG có tương quan tuyến tính với hoạt độ chống oxy hóa của chiết xuất thu được.

So sánh các quá trình chiết được thực hiện trong cùng thời gian và cùng nồng độ ethanol, dịch chiết nào được tiến hành ở nhiệt độ cao hơn sẽ cho hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn. Vì khi nhiệt độ chiết cao, chuyển động của dung môi tăng, làm tăng hiệu quả thẩm thấu dung môi vào tế bào lá, nên việc chiết rút các chất hòa tan từ lá ra ngoài triệt để hơn. Đồng nghĩa với hàm lượng polyphenol trong dịch chiết nhiều hơn nên hàm lượng EGCG cũng cao hơn và hiệu quả chống oxy hóa cũng tốt hơn.

Ở cùng điều kiện nhiệt độ và nồng độ ethanol, quá trình chiết được thực hiện trong thời gian lâu hơn sẽ thu được dịch chiết có hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn.

Trong cùng điều kiện về nhiệt độ và thời gian, nói chung nồng độ ethanol càng lớn sẽ thu được dịch chiết có hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa càng cao trừ trường hợp so sánh mức (0, 1,215, 0) với mức (0,0,0).

Từ kết quả thực nghiệm ở bảng trên, sau khi sử dụng MS Excel để tính toán theo [14], chúng tôi xác định được các phương trình hồi quy mô tả ảnh hưởng của các yếu tố nghiên cứu đến các hàm mục tiêu. Sau khi kiểm tra ý nghĩa của các hệ số phương trình, chúng tôi loại bỏ đi những hệ số không có nghĩa và kiểm tra độ tương thích của phương trình với kết quả thực nghiệm. Kết quả cho thấy tất cả các phương trình tìm được đều có ý nghĩa ở mức $\alpha = 5\%$.

Phương trình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố nghiên cứu đến nồng độ EGCG y_1 (mM) và hoạt độ chống oxy hóa y_2 (%) có dạng:

$$y_1 = 1,013 + 0,034 x_1 + 0,022 x_2 + 0,045 x_3 + 0,006 x_1 x_2 - 0,012 x_2 x_3 - 0,010 x_1^2 - 0,006 x_2^2 + 0,014 x_3^2.$$

Tương tự, phương trình mô tả ảnh hưởng của các yếu tố nghiên cứu đến hoạt độ chống oxy hóa của dịch chiết chè có dạng:

$$y_2 = 67,932 + 2,046x_1 + 1,325x_2 + 1,762x_3 - 0,883 x_2x_3 - 0,772 x_1^2 - 0,497x_2^2 + 0,677x_3^2.$$

Các phương trình trên cho thấy giữa các biến nghiên cứu có sự tương tác lẫn nhau. Sử dụng công cụ Solver của phần mềm MS Excel, chúng tôi tìm các điều kiện chiết tối ưu để dịch chiết có hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa lớn nhất, kết quả tính được được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định các điều kiện chiết tối ưu

Hàm mục tiêu	Biến mã			Biến thực		
	x_1	x_2	x_3	$Z_1, ^\circ\text{C}$	$Z_2, \%\text{v EtOH}$	$Z_3, \text{phút}$
$y_{1 \max} = 1,125 \text{ mM}$	1,215	0,250	1,215	82,2	72,5	32,2
$y_{2 \max} = 72,90 \%$	1,215	0,502	1,215	82,2	75	32,2

Để kiểm chứng lại kết quả của quá trình tối ưu hóa, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm kiểm chứng tại các điều kiện tối ưu được xác định. Kết quả tiến hành thí nghiệm ở điều kiện nhiệt độ 82,2°C, nồng độ ethanol 72,5°, thời gian 32,2 phút cho dịch chiết có nồng độ EGCG 1,100 mM. Thực hiện chiết ở điều kiện nhiệt độ 82,2°C, nồng độ ethanol 75°, thời gian 32,2 phút cho dịch chiết có hoạt tính chống oxy hóa là 72,98%

Các kết quả kiểm chứng rất gần với kết quả theo lý thuyết nên có thể tin cậy được mô hình trên.

Kết quả nghiên cứu xác định điều kiện chiết chất chống oxy hóa tốt nhất trong các nghiên cứu thực hiện trên thế giới không có sự thống nhất và có khác biệt so với kết quả trên đây. Trong khi Gordan Rusak và cộng sự [17] xác định chiết với ethanol 40° tốt hơn với ethanol 70° thì Anna Gramza và cộng sự [18] báo cáo ethanol ở 95° có khả năng chiết polyphenol từ chè xanh tốt nhất và hàm lượng polyphenol này cũng có quan hệ tuyến tính với hoạt độ chống oxy hóa của dịch chiết được.

Từ kết quả ở bảng 4, chúng ta có thể tính được hàm lượng EGCG chiết được từ lá chè già là 6,45% (tính theo chất khô). So với hàm lượng EGCG có trong lá chè non được công bố từ 8-12% [4, 6], hàm lượng chiết được từ lá chè già ở đây cũng rất đáng kể và như vậy có thể tận dụng nguồn nguyên liệu này cho mục đích khai thác sản xuất thực phẩm chức năng hay các chế phẩm chống oxy hóa ứng dụng trong thực phẩm.

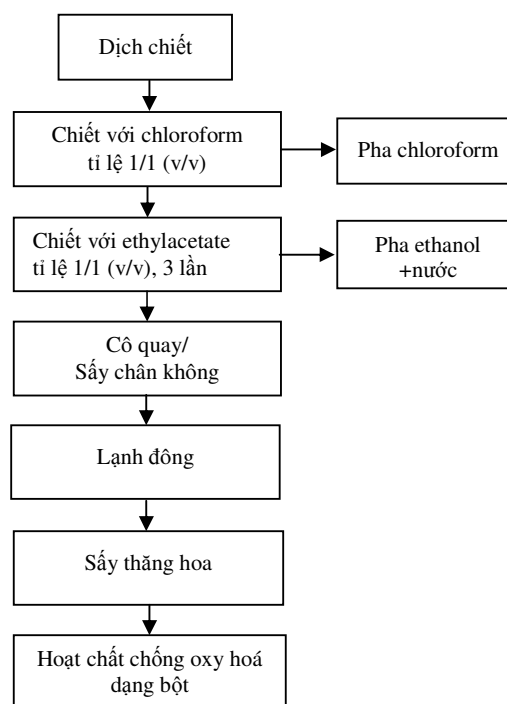
3.3. Xây dựng quy trình thu chế phẩm chống oxy hóa từ dịch chiết với dung môi ethanol

Dịch chiết với ethanol có màu xanh diệp lục và chứa các thành phần phân cực khác như đường, axit amin, protein, cafein. Diệp lục hỗ trợ quá trình oxy hóa, do đó để đạt hiệu quả chống oxy hóa cao, cần loại bỏ thành phần này. Đường, axit amin, protein có thể gây các phản ứng không mong muốn trong những sản phẩm được xử lý ở nhiệt độ cao nên cũng cần loại bỏ. Từ chiết xuất với ethanol chúng tôi chuẩn bị chế phẩm dạng bột theo sơ đồ ở hình 1.

Chlorophyll và các thành phần ưa béo được loại bỏ khỏi dịch chiết ethanol bằng cách chiết với chloroform, sử dụng tỉ lệ 1 : 1 (v/v). Sau khi chiết, bỏ pha chloroform có màu xanh diệp lục, pha ethanol/nước thu được có màu vàng nhạt.

Các thành phần tạp chất có độ phân cực cao được loại bỏ bằng cách chiết với ethyl acetate, là dung môi ít phân cực hơn (tỉ lệ 1 : 1 theo thể tích). Để đạt hiệu quả chiết cao, chúng tôi khảo sát số lần chiết cần thực hiện như sau:

Lấy 50 ml chiết xuất chè màu vàng sau khi loại bỏ pha chloroform và đem chiết với cùng thể tích ethyl acetate. Sau khi tách pha loại bỏ pha ethyl acetate, dịch thu được tiếp tục chiết với cùng một lượng thể tích ethyl acetate mới. Lặp lại quy trình chiết trên thêm một lần.



Hình 1. Quy trình thu nhận chế phẩm chống oxy hóa dạng bột

Bảng 5. Hàm lượng EGCG trong các pha chiết

Mẫu	EGCG (mmol)	Hiệu suất (%)
Chiết xuất ban đầu	0,391	
Pha ethylacetate chiết lần 1	0,253	65,0
Pha ethylacetate chiết lần 2	0,078	19,9
Pha ethylacetate chiết lần 3	0,005	2,6

Để xác định hàm lượng EGCG chiết được ở các pha, chúng tôi tiến hành như sau: bổ sung 15 ml nước cất vào mỗi pha ethyl acetate tách được và đem cô quay chân không để đuổi hoàn toàn ethyl acetate, định mức thể tích chiết xuất thu được. Chiết xuất này được đem đi phân tích HPLC để đánh giá hàm lượng EGCG. Kết quả xác định được trình bày ở bảng 5.

Tổng hiệu suất thu hồi qua 3 lần chiết: 87,5%. Tỷ lệ EGCG trong pha ethylacetate ở lần chiết thứ ba so với lượng EGCG ban đầu khá nhỏ (2.6%). Do đó chúng tôi đề xuất sử dụng quy trình chiết lặp 3 lần để đạt hiệu suất chiết cao.

Pha ethyl acetate sau 3 lần chiết được hòa trộn với nhau. Để thu chế phẩm dạng bột, chúng tôi bổ sung vào pha ethyl acetate 15 ml nước cất, đem đi cô quay chân không để đuổi hết ethyl acetate, sau đó đưa đi lạnh đông ở -20°C và sấy thăng hoa với nhiệt độ khay sấy 60°C và thời gian 6 giờ. Bột thu được có màu vàng nhạt, pha loãng có vị đắng và chát, có mùi chè xanh. Độ ẩm của sản phẩm là 7,6%.

3.4. Đánh giá độ bền hoạt tính chống oxy hóa của chế phẩm chống oxy hóa

Chế phẩm chống oxy hóa thu được, cũng như các chất chống oxy hóa khác, cần tránh để tiếp xúc với oxy không khí trong quá trình bảo quản. Để theo dõi độ bền của chế phẩm trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ phòng, chúng tôi cho chế phẩm vào các chai thủy tinh đầy nắp, bọc kín để tránh tiếp xúc với không khí và ánh sáng và cứ mỗi tuần lấy một phần chế phẩm đi xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH, xác định giá trị IC_{50} . Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Giá trị IC_{50} của các chế phẩm chống oxy hóa trong quá trình bảo quản

Mẫu Thời gian (tuần)	Bột chiết xuất chè xanh
1	7,7 ppm
2	12,4 ppm
3	13,3 ppm
4	15,3 ppm

Từ kết quả trên, chúng tôi nhận thấy hoạt tính chống oxy hóa của các chế phẩm đều thay đổi ít trong suốt thời gian bảo quản kín khí ở nhiệt độ thường.

Cũng bằng phương pháp DPPH, chúng tôi xác định được IC_{50} của BHT là 22,7 ppm. So sánh các giá trị IC_{50} , chúng ta có thể thấy chế phẩm bột chống oxy hóa từ lá chè già có hoạt tính mạnh hơn cả BHT.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lá chè già trồng tại Đà Nẵng hoàn toàn có khả năng khai thác để chiết hoạt chất chống oxy hóa. Cả nước và ethanol đều có khả năng chiết tốt hoạt chất chống oxy hóa, trong đó ethanol đã chứng tỏ khả năng chiết tốt hơn. Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm chúng tôi đã xây dựng mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của nhiệt độ, nồng độ rượu và thời gian chiết đến hàm lượng EGCG và hoạt tính chống oxy hóa của

chiết xuất thu được bằng phương pháp ninh chưng với dung môi ethanol, từ đó xác định được các điều kiện chiết để thu được dịch có hàm lượng EGCG lớn nhất hoặc hoạt tính chống oxy hóa lớn nhất. Hàm lượng EGCG lớn nhất chiết được từ nguồn này đạt 6,45%, khoảng bằng 2/3 so với lượng EGCG được công bố có trong lá chè non. Đây có thể là phát hiện có ý nghĩa, cho thấy khả năng khai thác hoạt chất này từ lá chè già. EGCG không chỉ có tác dụng chống oxy hóa mà còn có nhiều đặc tính sinh học quý khác được ứng dụng trong y học và mỹ phẩm.

Cũng trong nghiên cứu này chúng tôi đã đề xuất quy trình thu chế phẩm dạng bột từ dịch chiết, trong đó đã loại bỏ được phần lớn tạp chất chính như chlorophyll và các hợp chất phân cực mạnh. Chế phẩm dạng bột thu được có hoạt tính rất mạnh, hơn cả hoạt tính của BHT và bền trong thời gian bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng, kín khí, tránh ánh sáng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cabrera C., Gimenez R. - Lopez CM-Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, J. Agric. Food Chem **51** (2003) 4427-4435.
2. Gramza A. and Korczak J. - Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems, Trends in Food Science and Technology **16** (2005) 351-358.
3. Nurulain T. Zaveri - Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications, Life Sciences **78** (2006) 2073-2080.
4. Pokorny Jan - Antioxidants in Food, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2001.
5. Yusuf Yilmaz - Novel uses of catechins in foods, Trends in Food Science & Technology **17** (2006) 64-71.
6. Yukihiko Hara - Green tea: Health benefits and applications, Marcel Dekker Incorporated, 2001.
7. Amra Perva-Uzunalic, Mojca Skergeta, Zeljko Kneza, Bernd Weinreich, Frank Otto, Sabine Gruner - Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine, Food Chemistry **96** (2006) 597-605.
8. Beata, Agnieszka Stepniewska, Rafał Wołosiaś Warsaw - The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts, Technologia Alimentaria **6** (1) (2007) 27-36.
9. Conrad Astill và cộng sự - Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions, J. Agric. Food. Chem. **49** (2001) 5340-5347.
10. Fernandez P. L. et al - Study of catechin and xanthine tea profile as geographical tracers, J. Agric. Food Chem **50** (2002) 1833-1839.
11. Yuko Yoshida, Masaaki Kiso, Tetsuhisa Goto - Efficiency of the extraction of catechins from green tea, Food Chemistry **67** (1999) 429-433.
12. Lin Y., Tsai Y., Tsai J., Lin J. - Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves, J. Agric. Food. Chem. **51** (2003) 1864-1873.
13. Lu M. J. and Chen C. - Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea, Food Research International **41** (2008) 130-137.
14. Eisei Nishitani, Yuko M. Sagesaka - Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method, J. Food Composition and Analysis **17** (2003) 675-685.

15. Nguyễn Minh Tuyên - Quy hoạch thực nghiệm, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2005.
16. B. B. Borse, H. Vijay Kumar, L. Jagan Mohan Rao - Radical Scavenging Conserves from Unused Fresh Green Tea Leaves, J. Agric. Food Chem. **55** (5) (2007) 1750-1754.
17. Xuejun Pan, Guoguang Niu and Huizhou Liu - Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, Chemical Engineering and Processing **42** (2) (2003) 129-133.
18. Gordan Rusak, Drazenka Komes, Saša Likic, Dunja Horzic, Maja Kovac - Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used, Food Chemistry **110** (2008) 852-858.
19. Anna Gramza và cộng sự -Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content, Eur. J. Lipid Sci. Technol. **108** (2006) 351-362.

SUMMARY

STUDY ON EXTRACTION OF NATURAL ANTIOXIDANTS FROM OLD TEA LEAVES

Natural antioxidants are of great interest in food industry recently from the aspect of their ability to replace synthetic antioxidants whose use has been restricted. Tea is well known as the source of many antioxidant compounds, but there are few studies on the use of fresh old tea leaves, although they are abundant in Vietnam as well as the surrounding area of Da Nang. Using DPPH method to evaluate the radical scavenging activity and HPLC to monitor the EGCG level, the old tea leaves from Da Nang were proven to contain large amount of antioxidants, which could be retrieved for production of natural antioxidant additive. From the result of the designed experiment, we found the best conditions for extraction of antioxidants with ethanol, according to which at temperature of 82.2°C, ethanol concentration of 72.5°, extraction time of 32.2 min, the EGCG level in the extract was maximum, meanwhile at temperature of 82.2°C, ethanol concentration of 75°, extraction time of 32.2 min, the extract had the highest antioxidant activity. Also in this study, we proposed the procedure for obtaining antioxidant extract in form of powder, which was cleaned almost completely from impurities and was stable during storage with absence of air and light.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 10 tháng 5 năm 2009

Bộ môn Công nghệ thực phẩm, Khoa Hóa,
Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng.