

# NGHIÊN CỨU TRÍCH LI POLYPHENOL TỪ CHÈ XANH VỤN

## PHẦN 2. TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH TRÍCH LI POLYPHENOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÀM MONG ĐỢI

VŨ HỒNG SƠN, HÀ DUYÊN TƯ

### 1. GIỚI THIỆU

Polyphenol chè xanh được trích li bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, nhưng phương pháp trích li cô điển bằng nước vẫn được ứng dụng rộng rãi do ưu điểm nổi trội về hiệu quả kinh tế cao. Nhiều tác giả trong nước và trên thế giới đã tiến hành nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích li polyphenol chè xanh [5, 12, 14]. Trong phần 1 [2] chúng tôi đã đi sâu nghiên cứu các yếu tố chính ảnh hưởng đến hai chỉ tiêu chất lượng của quá trình là hiệu suất trích li và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol.

Trong công trình này chúng tôi nghiên cứu tiếp điều kiện tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng, để đạt giá trị của hai mục tiêu đạt tối ưu. Đây là bài toán điều khiển tối ưu hai mục tiêu, đa yếu tố. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm tỏ rõ có nhiều hiệu quả và ưu thế hơn các phương pháp nghiên cứu cô điển chỉ cho phép nghiên cứu từng biến độc lập hoặc các phương pháp toán học khác do có thể nghiên cứu nhiều yếu tố ảnh hưởng đồng thời với số ít thí nghiệm, tiết kiệm thời gian và chi phí [10, 11]. Trong đó, phương pháp hàm mong đợi do Harrington đưa ra [1, 9] và tiếp tục phát triển bởi Derringer và Suich [6] được coi là công cụ rất hữu hiệu để giải bài toán này. Một bước trung gian cần thực hiện theo phương pháp này là từ hàm hồi quy giữa chỉ tiêu cần tối ưu và các biến ảnh hưởng, tính hàm mong đợi cho các mục tiêu ở từng thí nghiệm trong ma trận thực nghiệm. Việc tính hàm mong đợi, chấp nhận mục tiêu được thực hiện với sự trợ giúp của phần mềm Design-Expert [7].

### 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### 2.1. Nguyên vật liệu

- Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu là chè vụn được lấy từ cơ sở sản xuất chè xanh ở vùng Phú Hộ (Phụ Thọ) vào vụ Đông. Mẫu chè được bảo quản trong 2 lớp túi polyetylen kín ở nơi khô ráo, thoáng mát.

- Axit galic của BDH (Anh), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của Sigma-Aldrich (Đức).

- Các hóa chất, dung môi khác đạt độ tinh khiết phân tích (Trung Quốc).

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết chè

### *a. Mẫu dịch chè xác định polyphenol tổng số*

Kết hợp phương pháp xác định tổng lượng chất tan theo Voronxop [3] và phương pháp phân tích polyphenol chuẩn [8], tiến hành chuẩn bị mẫu như sau: cân chính xác lượng chè vụn (khoảng 3 g) đã nghiền nhỏ, chuyển vào bình cầu 250 ml (có lắp sinh hàn), thêm 150 ml nước cất, chỉnh pH = 3,5 bằng HCl 1 N, trích li trong 1 giờ. Lọc dịch chè, cô quay chân không, định mức về 100 ml. Dịch chiết chè được bảo quản lạnh, trong lọ kín, dùng cho phân tích tổng lượng polyphenol.

### *b. Mẫu thí nghiệm*

Cân chính xác (khoảng 3 g) chè vụn đã nghiền nhỏ, chuyển vào bình cầu 250 ml (có lắp sinh hàn) và tiến hành trích li trong bể điều nhiệt ở các điều kiện xác định về thời gian, nhiệt độ, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu và pH. Lọc dịch chè, cô quay chân không, định mức về 100 ml. Dịch chiết chè được bảo quản lạnh, trong lọ kín.

#### *2.2.2. Định lượng polyphenol tổng số*

Định lượng polyphenol tổng số được tiến hành theo phương pháp Folin-Denis (AOAC 952.03-2000) [4].

#### *2.2.3. Hoạt tính chống oxy hóa-khả năng quét gốc tự do DPPH*

Hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol được xác định dựa trên khả năng quét gốc tự do DPPH [13]. Các mẫu dịch chiết chè được chuẩn bị có hàm lượng polyphenol (tương đương axit galic) 100 ppm.

#### *2.2.4. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm*

Sử dụng quy hoạch trực giao đối xứng cho 4 yếu tố: thời gian, pH, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (v/m) và nhiệt độ trích li, mỗi yếu tố tiến hành tại 5 mức (- $\alpha$ , -1, 0, +1, + $\alpha$ ) như Bảng 1, với  $\alpha = 1,414$ . Quy hoạch thực nghiệm gồm 27 thí nghiệm, trong đó: 16 thí nghiệm tại nhân (quy hoạch toàn phần  $2^4$ ), 8 thí nghiệm tại điểm sao (2 thí nghiệm cho mỗi biến) và 3 thí nghiệm lặp tại tâm, với 2 hàm mục tiêu: hiệu suất trích li và hoạt tính chống oxy hóa (bảng 2).

### **2.3. Xử lý số liệu**

Kết quả được xử lý bằng phần mềm thống kê Design-Expert 7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA), để phân tích các hệ số hồi quy, bề mặt đáp ứng và tối ưu hóa với thuật toán hàm mong đợi.

## **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Chọn miền khảo sát**

Hiệu suất trích li và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol chè xanh phụ thuộc nhiều vào các yếu tố như: thời gian, pH, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu, nhiệt độ trích li và đã được nghiên cứu trong phần trước [2]. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn miền khảo sát của các yếu tố

để tiến hành tối ưu quá trình trích li với các giá trị như sau: thời gian (45 ÷ 60 phút), pH (2,5 ÷ 4,5), tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (5/1 ÷ 15/1, v/m), nhiệt độ trích li (80 ÷ 95°C) như trong bảng 1.

Bảng 1. Giá trị mã hóa và thực nghiệm của các yếu tố thực nghiệm

Biến số	Kí hiệu	Đơn vị	Mức				
			-α	-1	0	+1	+α
Thời gian	A	phút	42	45	53	60	63
pH	B		2.1	2.5	3.5	4.5	4.9
Tỉ lệ dmôi/nliệu	C	v/m	3	5	10	15	17
Nhiệt độ	D	°C	77	80	88	95	98

### 3.2. Thiết lập mô hình

Kết quả thực nghiệm trích li polyphenol theo quy hoạch trực giao đối xứng 4 yếu tố được cho trong bảng 2. Tiến hành xây dựng hàm hồi quy bậc 2 cho các mục tiêu:

Hiệu suất trích li

$$Y_1 = a_0 + a_1A + a_2B + a_3C + a_4D + a_{12}AB + a_{13}AC + a_{14}AD + a_{23}BC + a_{24}BD + a_{34}CD + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 + a_{33}C^2 + a_{44}D^2$$

Hoạt tính chống oxy hóa

$$Y_2 = b_0 + b_1B + b_2B + b_3C + b_4D + b_{12}BB + b_{13}BC + b_{14}BD + b_{23}BC + b_{24}BD + b_{34}CD + b_{11}B^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2 + b_{44}D^2$$

Bảng 2. Các thí nghiệm tiến hành và kết quả

TN	A	B	C	D	Hiệu suất- Y <sub>1</sub> (%)	Hoạt tính- Y <sub>2</sub> (%)
1	45	2,5	5	80	33,40	39,51
2	60	2,5	5	80	32,41	38,13
3	45	4,5	5	80	31,89	37,72
4	60	4,5	5	80	28,27	36,05
5	45	2,5	15	80	78,98	51,33
6	60	2,5	15	80	77,19	46,11
7	45	4,5	15	80	74,74	36,45
8	60	4,5	15	80	70,14	30,79
9	45	2,5	5	95	25,27	19,63
10	60	2,5	5	95	28,11	20,38
11	45	4,5	5	95	26,55	18,76

12	60	4,5	5	95	26,73	19,14
13	45	2,5	15	95	78,77	32,27
14	60	2,5	15	95	80,99	29,04
15	45	4,5	15	95	77,83	18,12
16	60	4,5	15	95	77,17	14,39
17	42	3,5	10	88	45,03	32,07
18	63	3,5	10	88	44,06	28,65
19	53	2,1	10	88	42,95	30,10
20	53	4,9	10	88	38,88	18,48
21	53	3,5	3	88	12,00	33,23
22	53	3,5	17	88	79,49	38,26
23	53	3,5	10	77	54,20	47,15
24	53	3,5	10	98	53,39	21,56
25	53	3,5	10	88	38,08	33,03
26	53	3,5	10	88	38,42	33,43
27	53	3,5	10	88	38,88	33,83

Bảng 3a. Kết quả phân tích hồi quy - hiệu suất trích li ( $Y_1$ )

Nguồn gốc	Phương sai	Chuẩn F	Giá trị p (khả năng > F)
Mô hình	887,80	6591,83	< 0,0001
A	3,04	22,59	0,0005
B	37,99	282,10	< 0,0001
C	11453,46	85040,63	< 0,0001
D	2,28	16,91	0,0014
AB	7,55	56,07	< 0,0001
AC	0,65	4,84	0,0481
AD	15,19	112,82	< 0,0001
BC	6,64	49,27	< 0,0001
BD	9,13	67,78	< 0,0001
CD	68,08	505,48	< 0,0001
A <sup>2</sup>	64,90	481,91	< 0,0001
B <sup>2</sup>	7,08	52,56	< 0,0001
C <sup>2</sup>	96,79	718,69	< 0,0001
D <sup>2</sup>	474,94	3526,41	< 0,0001
Không tương thích	0,13	0,80	0,6717

Bảng 3b. Kết quả phân tích hồi quy - hoạt tính chống oxy hóa ( $Y_2$ )

Nguồn gốc	Phương sai	Chuẩn F	Giá trị p (khả năng > F)
Mô hình	173,71	690,26	< 0,0001
A	30,27	120,27	< 0,0001
B	331,40	1316,85	< 0,0001
C	65,92	261,94	< 0,0001
D	1629,90	6476,57	< 0,0001
AB	0,16	0,64	0,4404
AC	15,84	62,93	< 0,0001
AD	4,10	16,29	0,0017
BC	175,70	698,15	< 0,0001
BD	0,62	2,48	0,1413
CD	0,44	1,73	0,2129
A <sup>2</sup>	9,40	37,34	< 0,0001
B <sup>2</sup>	145,92	579,84	< 0,0001
C <sup>2</sup>	24,32	96,64	< 0,0001
D <sup>2</sup>	8,22	32,67	< 0,0001
Không tương thích	0,27	1,69	0,4288

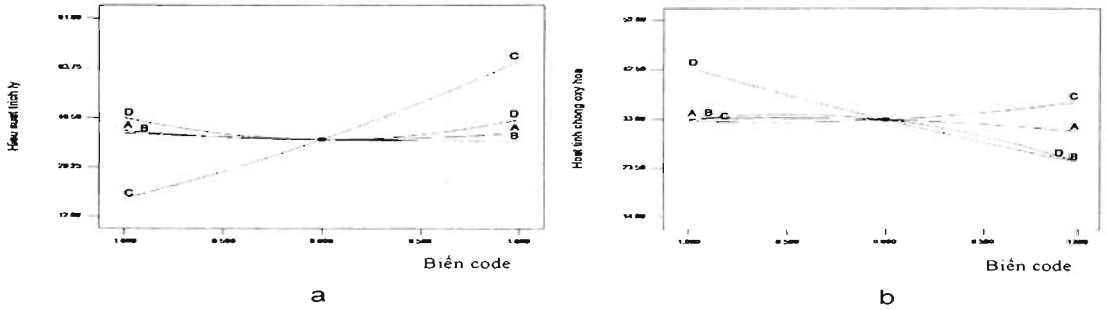
Kiểm tra sự có nghĩa của các hệ số và sự thích ứng của mô hình được tiến hành bằng phân tích hồi quy (bảng 3a, 3b). Chuẩn F của hai mô hình lần lượt bằng: 6591,83 ( $Y_1$ ), 690,26 ( $Y_2$ ) cho thấy hai mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99% ( $p < 0,0001$ ). Sự có nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định bởi chuẩn F, các giá trị  $p < 0,05$  cho biết các hệ số hồi quy có nghĩa, như vậy trong mô hình  $Y_1$  tất cả các hệ số hồi quy đều có nghĩa. còn trong mô hình  $Y_2$  chỉ có các hệ số tương tác AB, BD, CD là không có nghĩa nhưng vẫn được giữ lại trong mô hình để tiến hành tối ưu hóa. Chuẩn F cho “sự không tương thích” của mô hình  $Y_1$  là 0,80 ( $p = 0,6717$ ) và  $Y_2$  là 1,69 ( $p = 0,4288$ ) cho thấy hai mô hình hoàn toàn tương thích với thực nghiệm. Thêm vào đó hệ số tương quan bội ( $R^2$ ) của 2 mô hình lần lượt bằng 0,9999 và 0,9988 cho thấy mô hình mô phỏng đúng với thực nghiệm. Như vậy hiệu suất trích li và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol được biểu diễn bằng mô hình bậc 2 như sau:

$$Y_1 = 38,84 - 0,39A - 1,38B + 23,93C - 0,34D - 0,69AB - 0,20AC + 0,97AD - 0,64BC + 0,76BD + 2,06CD + 2,71A^2 + 0,90B^2 + 3,31C^2 + 7,34D^2$$

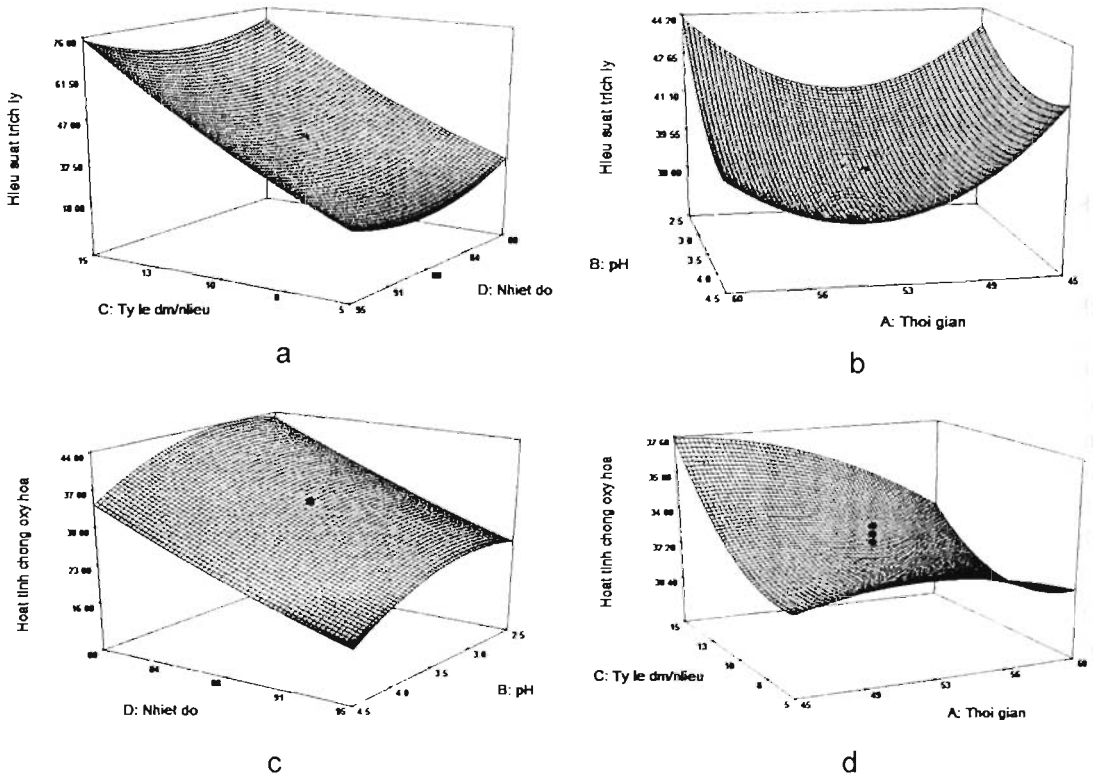
$$Y_2 = 32,86 - 1,23A - 4,07B + 1,82C - 9,03D - 0,10AB - 0,99AC + 0,51AD - 3,31BC + 0,20BD + 0,16CD - 1,03A^2 - 4,07B^2 + 1,66C^2 + 0,97D^2$$

Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung tâm) đến hiệu suất trích li (hình 1a) và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol (hình 1b). ta thấy tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (C) và nhiệt độ trích li (D) có ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất: hoạt tính chống

oxy hóa chịu ảnh hưởng mạnh của yếu tố nhiệt độ trích li (D) và pH (B). Điều đó được minh họa rõ hơn khi nghiên cứu bề mặt đáp ứng của hàm  $Y_1$  (hình 2a, 2b) và hàm  $Y_2$  (hình 2c, 2d). Hiệu suất trích li chịu ảnh hưởng mạnh nhất bởi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu, khi chỉ số này tăng, hiệu suất tăng mạnh. Tiếp theo yếu tố nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt hơn hai yếu tố thời gian và pH đến hiệu suất. Trong khi đó, nhiệt độ trích li lại ảnh hưởng mạnh nhất đến hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol: nhiệt độ tăng làm giảm hoạt tính. Hai yếu tố pH và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu có ảnh hưởng ngược nhau đến hoạt tính: pH tăng kéo theo làm giảm hoạt tính, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu tăng làm tăng hoạt tính chống oxy hóa. Thời gian trích li trong miền khảo sát có ảnh hưởng ít đến hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol chèn xanh.



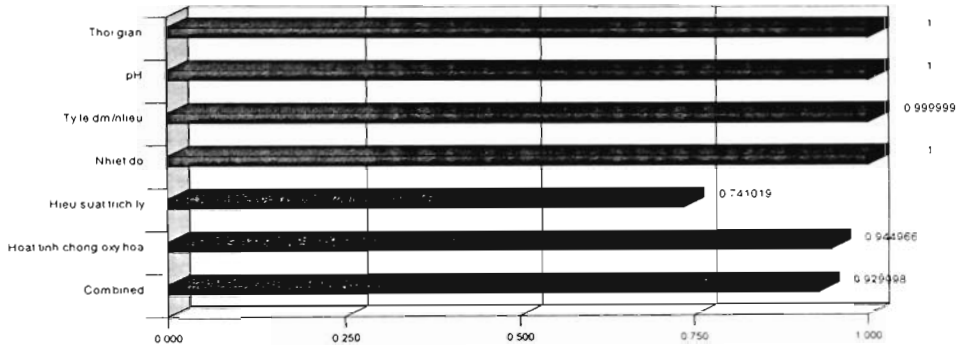
Hình 1. Ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình trích li polyphenol



Hình 2. Bề mặt đáp ứng của hiệu suất trích li và hoạt tính chống oxy hóa của polyphenol

### 3.3. Tối ưu hóa quá trình trích li polyphenol

Quá trình trích li polyphenol từ chè xanh vụn cần được tiến hành sao cho thu được chế phẩm polyphenol với hiệu suất và hoạt tính chống oxy hóa cao. Ta tiến hành giải bài toán tối ưu hóa bằng cách chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi” được đưa ra bởi Derringer và Suich [6]. Kết quả tối ưu hóa bằng phần mềm Design-Expert 7.1 như sau: thời gian trích li 42 phút, pH 2,9, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 10/1 và nhiệt độ trích li 77°C; khi đó hiệu suất đạt 63,12% và hoạt tính chống oxy hóa 49,30%. Với phương án tối ưu này thì các yêu cầu đối với 4 yếu tố ảnh hưởng đều đạt 100% mong muốn, mục tiêu về hiệu suất đạt khoảng 74% mong muốn, hoạt tính chống oxy hóa đạt 95% mong muốn và mục tiêu chung đạt 93% (hình 3).



Hình 3. Mức độ đáp ứng sự mong đợi

## 4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sử dụng bề mặt đáp ứng trong mô hình tối ưu bậc 2 và chấp mục tiêu theo thuật toán “hàm mong đợi”, chúng tôi đã tìm được điều kiện tối ưu cho quá trình trích li polyphenol từ chè xanh vụn bằng nước như sau: thời gian trích li 42 phút, pH 2,9, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 10/1 (v/m) và nhiệt độ trích li 77°C. Hiệu suất trích li đạt 63,12% và hoạt tính chống oxy hóa 49,30%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Công Cường, Bùi Minh Trí - Xác suất và thống kê ứng dụng, NXB Giao thông vận tải, Hà Nội, 1997, tr. 307-311.
2. Vũ Hồng Sơn, Hà Duyên Tư - Nghiên cứu trích li polyphenol từ chè xanh vụn. Phần 1. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình trích li polyphenol, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 47 (1) (2009) 81-86.
3. Vũ Thy Thu, Đoàn Hùng Tiến, Đỗ Thị Gấm, Giang Trung Khoa - Các hợp chất hóa học có trong chè và một số phương pháp phân tích thông dụng trong sản xuất chè ở Việt Nam, NXB Nông Nghiệp, 2001.
4. AOAC - Official Method 952.03, 2000.
5. Beata Druzynska, Agnieszka Stepniowska, Rafal Wolosiak - The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment 6 (1) (2007) 27-36.

6. Derringer G., Suich R. - Simultaneous optimization of several responses variables, *Journal of quality technology* **12** (4) (1980) 214-219.
7. Design-Expert version 7.1 - Software for design of experiments, Stat-Ease. Inc., Minneapolis, USA, 2007.
8. Hara Yukihiko - Process for the production of a natural antioxidant obtained from tea leaves, US patent 4,673,530, 1987.
9. Harrington E. C. Jr. - The desirability function, *Industrial quality control* **21** (10) (1965) 494-498.
10. Montgomery D.C. - Design and analysis of experiments, 5<sup>th</sup> Edition, John Wiley and Sons, New York, 2001.
11. Myers R.H., Montgomery D.C. - Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley and Sons, New York, 2002.
12. Pham Thanh Quan, Tong Van Hang, Nguyen Hai Ha, Do Nguyen Tuyet Anh, Truong Ngoc Tuyen - Extraction of polyphenols from green tea using microwave assisted extraction method, In: Proceedings of the 9th conference on science and technology, Ho Chi Minh City University of Technology, October 2005, pp. 42-45.
13. Qin Yan Zhu, Robert M. Hackman, Jodi L. Esunsa, Roberta R. Holt, and Carl L. Keen - Antioxidative activities of Oolong tea, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 6929-6934.
14. Yuko Yoshida, Masaaki Kiso, Tetsuhisa Goto - Efficiency of the extraction of catechins from green tea, *Food Chemistry* **67** (1999) 429-433.

## SUMMARY

### STUDY ON POLYPHENOL EXTRACTION FROM DUST GREEN TEA PART 2. OPTIMIZATION OF POLYPHENOL EXTRACTION USING DESIRABILITY METHODOLOGY

In this study, polyphenol extraction from dust green tea was performed by water solvent. The tea extract was analysed for the content of total polyphenols by Folin-Denis method and the antioxidant activity of this extract was determined by DPPH free radical scavenging effect. Thus polyphenol extraction was optimized by using desirability methodology with experimental order of central composite orthogonal design (CCOD). Four main effective factors namely temperature, pH, solvent/material ratio (v/m) and extraction time were studied. The statistical analysis showed that in studied range the solvent/material ratio and temperature have had significant effects on extraction yield; meanwhile antioxidant activity was influenced by temperature, pH and solvent/material ratio. The optimal condition for polyphenol extraction was as follows: extraction time 42 minutes, pH 2.9, solvent/material ratio 10/1 (v/m) and extraction temperature 77°C. Extraction yield and antioxidant activity have reached to 63.12%, 49.30%, respectively.

*Địa chỉ:*

*Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2008*

Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.