

Chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf

Cang H. Mai*, Nguyen H. Nguyen, Giao T. Huynh, & Y T. N. Le

Department of Chemical Engineering, Nong Lam University, Ho Chi Minh city, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: July 19, 2018

Revised: December 22, 2018

Accepted: February 28, 2019

Keywords

Chlorophyll

Egyptian Luffa

Egyptian Luffa leaf

*Corresponding author

Mai Huynh Cang

Email: maihuynhcang@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

This study examined factors affecting on chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf for using as food colorant. Optimal conditions for chlorophyll extraction were ethanol 96% for 97 minutes at 49⁰C and extraction speed at 123 rpm. The quality of extracts was investigated for microorganisms, heavy metals and antioxidant activity by using the DPPH (2-2-diphenyl-1-DPPH) method. The free radical scavenging activities of extract presented by the IC₅₀ value was 261,7 µg/mL.

Cited as: Mai, C. H., Nguyen, N. H., Huynh, G. T., & Le, Y. T. N. (2019). Chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 99-107.

Nghiên cứu tách chiết Chlorophyll từ lá mướp (*Egyptian Luffa*)

Mai Huỳnh Cang*, Nguyễn Hồng Nguyên, Huỳnh Thị Giao & Lê Thị Như Ý

Bộ Môn Công Nghệ Hóa Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 19/07/2018

Ngày chỉnh sửa: 22/12/2018

Ngày chấp nhận: 28/02/2019

Từ khóa

Chlorophyll
Egyptian Luffa
Lá mướp

*Tác giả liên hệ

Mai Huỳnh Cang

Email: maihuynhcang@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết chlorophyll từ lá mướp nhằm ứng dụng tạo màu trong thực phẩm. Điều kiện tối ưu để tách chiết chlorophyll trong lá mướp là chiết ngâm đậm với ethanol 96%, thời gian chiết là 97 phút, nhiệt độ chiết là 49^oC, tốc độ khuấy là 123 vòng/phút. Chế phẩm màu được xác định chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng và khả năng kháng oxi hóa bằng phương pháp DPPH (2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll thể hiện qua giá trị IC₅₀ là 261,7 µg/mL.

1. Đặt Vấn Đề

Cây mướp hương (*Egyptian Luffa*) là một loại cây thảo dạng dây leo sống ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, lá đơn dạng mọc cách, phiến lá hình trái xoan, đáy hình tim, mép lá có răng cưa (Nguyen, 2016). Lá mướp khi già được sử dụng để tạo các thực phẩm có màu xanh tương tự như lá dứa, ngoài ra lá mướp còn được sử dụng như một loại thảo dược do chúng có chứa các chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là khả năng kháng khuẩn và kháng oxi hóa. Theo Nguyen (2016), lá mướp có khả năng kháng các loại vi khuẩn như *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Samonela Typhi* do có chứa saponin, alkaloid và glycoside. Thành phần hóa lý trong lá mướp tươi trình bày Bảng 1 (Nguyen, 2016). Chất diệp lục (chlorophyll) là một sắc tố màu xanh lá cây được tìm thấy trong hầu hết tất cả các thực vật, tảo và vi khuẩn *Cyanobacteria*. Chất diệp lục là một sắc tố màu xanh lá cây bao gồm vòng tetrapyrrole với một ion magiê ở trung tâm, nó có một đầu kỵ nước dài là chuỗi phytol trong cấu trúc phân tử (Rajalakshmi & Banu,

2015). Có hai loại chất diệp lục chính là chlorophyll a và chlorophyll b (Hosikian & ctv., 2010). Sự khác biệt giữa hai chất diệp lục này là một nhóm methyl trong chlorophyll a được thay thế bởi một nhóm formyl trong chlorophyll b (Rajalakshmi & Banu, 2015).

Chlorophyll a là sắc tố chính trong thực vật, chúng chuyển đổi năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học thông qua quá trình quang hợp (Costache & ctv., 2012). Vì chlorophyll là các sắc tố xanh có chứa một vòng porphyrin xung quanh các electron tự do nên chúng có thể nhận hoặc cho electron dễ dàng. Vì vậy, sau khi hấp thụ năng lượng của ánh sáng, chlorophyll sẽ cung cấp các electron năng lượng tới một bộ tế bào để bắt đầu quá trình quang hợp (Ridwan & ctv., 2017). Quang hợp là một quá trình sử dụng năng lượng ánh sáng cùng với nước và carbon đioxit để tạo ra oxy và carbohydrate cung cấp cho sự sống trên trái đất (Hosikian & ctv., 2010).

Tính chất lý học quan trọng nhất là chlorophyll có khả năng hấp thụ năng lượng ánh sáng chọn lọc. Quang phổ hấp thụ cực đại của chlorophyll vùng tia xanh (λ : 430 - 460 nm) và vùng ánh

Bảng 1. Thành phần hóa lý trong lá mướp tươi¹

Trong 100 g lá mướp tươi							
Nước (g)	Năng lượng (kcal)	Chất đạm (g)	Chất béo (g)	Chất xơ (g)	Tro (g)	Calcium (mg)	Phosphate (mg)
94	14	1,6	0,1	2,7	1,6	330	33

Nguồn: Nguyen (2016).

sáng đỏ (λ : 620 - 700 nm). Chlorophyll dễ bị biến đổi thành pheophytin (có màu olive) trong môi trường acid và nhiệt độ cao do hydro thay vào vị trí nhân Mg (Ngo, 2012).

Hiện nay, chlorophyll được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như: chất màu tự nhiên trong thực phẩm (Putra & ctv., 2017); tổng hợp trong ngành hóa học và vật lý cho các ứng dụng khác nhau là điện tử, photo-physics, quang điện, điện hóa (Rajalakshmi & Banu, 2015); cung cấp các lợi ích sức khỏe như chống đột biến và chống oxy hóa có vai trò tích cực trong việc phòng - tránh bệnh ung thư (Putra & ctv., 2017). Đặc biệt, với bản chất không độc hại của chlorophyll, tính chất kháng khuẩn và khử mùi nên chlorophyll là một sản phẩm chủ chốt trong điều trị nhiễm trùng miệng, loét mô, khối u, ung thư (Hosikian & ctv., 2010).

Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết chlorophyll từ lá mướp nhằm mục đích tạo chế phẩm màu tự nhiên dùng trong chế biến biến thực phẩm.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu chính được sử dụng là lá mướp hương (*Egyptian Luffa*) trồng tại Long An. Lá tươi (từ 4 đến 5 tháng, kích thước lá dài 8 - 16 cm, rộng 7 - 20 cm) rửa sạch, sấy khô tại 53°C, xay nhỏ (kích thước 0,5 mm < d < 1 mm), bảo quản trong túi zip ở nhiệt độ phòng (có silicagel hút ẩm).

Hóa chất sử dụng: Ethanol 99%, KI 99,9%, I₂ 99,9%, 1- α naphthol 99,9%, H₂SO₄ 98%, acid acetic 99%, FeCl₃ 99,9%, NaOH 20%, HCl 36,5%, chloroform 99% có nguồn gốc từ Trung Quốc, được mua tại Công ty TNHH Hóa Chất Bách Khoa, TP. Hồ Chí Minh.

Thiết bị sử dụng: Máy sấy khay (Bộ môn Công nghệ hóa, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh), máy cô quay chân không Stuart RE 300B (Mỹ), máy quang phổ UV-VIS Genesys 20 (Mỹ), cân

điện tử 3 số (Mỹ), bể điều nhiệt Memmert WNB (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát thành phần hóa lý của nguyên liệu lá mướp

Xác định chỉ tiêu hóa lý: độ ẩm (sấy, cân không đổi), hàm lượng tro tổng (TCVN-5253-90), đo màu (máy so màu Lab, Chroma meter CR- 400).

2.2.2. Định tính thành phần hóa học nguyên liệu (Chakraborty & ctv., 2017)

Alkaloid: 0,5 mL mẫu + 4 - 5 giọt dung dịch (2 g KI + 1,27 g I₂ + 100 mL H₂O). Dung dịch phản ứng có màu đỏ nâu.

Carbohydrates: Hòa tan 3,75 g 1- α naphthol + 25 mL ethanol 99% + 2 mL mẫu + 2 mL H₂SO₄ vào ống nghiệm sau đó trộn dung dịch, để yên 2-3 phút. Dung dịch phản ứng tách thành 2 màu đỏ và tím.

Glycoside: 5 mL mẫu + 2 mL acid acetic + 1 giọt FeCl₃ sau đó thêm từ từ H₂SO₄ đậm đặc. Dung dịch phản ứng có vùng màu nâu bề mặt.

Flavanoid: 2 mL mẫu + vài giọt NaOH 20%. Dung dịch phản ứng có màu vàng và bị mất màu khi thêm HCl loãng.

Phenol: 1 phần mẫu + dung dịch FeCl₃ 5%. Dung dịch phản ứng có màu xanh đậm hoặc đen.

Tannins: 2 mL mẫu + 1 mL HCl 1%. Sau phản ứng có kết tủa đỏ.

Saponin: 2 mL mẫu + 6 mL H₂O lắc mạnh dung dịch. Xuất hiện dịch khoảng 5 phút.

Terpenoids: 1 mL Chloroform + 2 mL mẫu + vài giọt H₂SO₄ đậm đặc. Sau phản ứng có kết tủa nâu hơi đỏ.

2.2.3. Khảo sát quá trình tách chiết chlorophyll trong lá mướp

Chiết chlorophyll trong lá mướp bằng phương pháp ngâm dầm, nguyên liệu khô có kích thước

từ 0,5 mm < d < 1 mm. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30. Khảo sát hàm lượng chiết chlorophyll khi thay đổi các yếu tố độ ẩm nguyên liệu (sau thời gian sấy 3 giờ, 5 giờ, 7 giờ và 8 giờ), nồng độ dung môi (ethanol 99,5, 96, 80 và 70%, v/v), nhiệt độ chiết (nhiệt độ phòng, 40 và 50°C), tốc độ khuấy (50, 100, 300 và 500 vòng/phút) và thời gian khuấy (30, 60, 90 và 120 phút).

Dùng phương pháp trắc quang UV – VIS để xác định hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết. Sau khi cô quay chân không để đuổi dung môi, chất khô sẽ được đem pha loãng để tiến hành đo quang. Lấy 2,5 ml dịch chiết pha loãng cho vào cuvet có kích thước 12,5 × 12,5 × 45 mm. Hệ số A nếu không vượt quá 2 sẽ được chấp nhận. Hàm lượng chlorophyll được tính theo phương pháp đo quang phổ kế UV-Vis.

2.2.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology) – kiểu quay tâm

Ba thông số của quá trình chiết: Thời gian khuấy (X_1), nhiệt độ khuấy (X_2) và tốc độ khuấy (X_3). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trục tâm quay (Rotatable Central Composite Design) với 15 thí nghiệm để xác định ảnh hưởng của các yếu tố và tối ưu hóa quá trình chiết chlorophyll a.

Phương trình tổng quát: $Y = aX_1^2 + bX_2^2 + cX_3^2 + abX_1X_2 + acX_1X_3 + bcX_2X_3$.

Trong đó: a, b, c lần lượt là hệ số của các thông số X_1 , X_2 , X_3 ; Y là hàm lượng chlorophyll.

2.2.5. Xác định các chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng của màu chlorophyll

Chế phẩm chlorophyll được đem đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật (*E. Coli*, *Salmonella*), kim loại nặng (Pb, Hg), vi sinh vật hiếu khí theo tiêu chuẩn 46/2007 QĐ-BYT.

2.2.6. Khảo sát khả năng kháng oxi hóa của chlorophyll theo phương pháp DPPH

Theo cơ chế bắt gốc tự do sẽ chuyển gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) từ màu tím sang vàng nhạt. Xác định khả năng bắt gốc tự do của chất nghiên cứu bằng phương pháp đo độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng $\lambda = 517$ nm. Ascorbic acid được sử dụng làm chất đối chiếu.

Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của chất nghiên cứu được tính theo công thức sau:

$$Q(\%) = \left(1 - \frac{A - A_c}{A_0 - A_c} \right) \times 100$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ của dung dịch chứa mẫu thử
 A_0 là độ hấp thụ của DPPH khi không có mẫu
 A_c là độ hấp thụ của dung dịch chứa chất đối chiếu

Giá trị IC_{50} được tính bằng phần mềm Graph-Pad Prism thông qua đường chuẩn phần trăm ức chế (đường chuẩn được xây dựng từ 6 nồng độ khác nhau).

2.2.7. Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán bằng phần mềm thống kê Statgraphics centurion XV để xác định độ ảnh hưởng của các yếu tố lên hàm lượng chlorophyll ở độ tin cậy 95%, sự khác biệt giữa các nghiệm thức thông qua bảng LSD. Sau khi thực hiện tất cả các thí nghiệm sơ bộ, tiến hành bố trí thí nghiệm tối ưu trục tâm quay Rotatable Central Composite Design để chọn ra điều kiện chiết chlorophyll phù hợp nhất.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Định tính thành phần hóa học nguyên liệu

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy trong dịch chiết lá mướp có chứa alkaloid, glycoside và saponin. Alkaloid và glycoside là những thành phần tạo vị đắng cho lá mướp, saponin là thành phần được lý có hoạt tính sinh học giúp tạo nên dược tính cho lá mướp. Hàm lượng tro tổng trong lá mướp nguyên liệu khoảng 2.5%. Độ ẩm theo cơ sở ướt là 79,9% (Bảng 3)

Bảng 2. Định tính thành phần hóa học trong dịch chiết lá mướp

Thành phần	Có	Không
Alkaloid	X	
Carbohydrates		X
Glycoside	X	
Flavanoid		X
Phenol		X
Tannins		X
Saponin	X	
Terpenoids		X
Quinones		X
Oxalate		X

Bảng 3. Các thành phần khác trong lá mướp tươi

Thành phần khác		Hàm lượng		
Hàm lượng tro tổng		2,598% ± 0.55		
Độ ẩm (wb)		79,9% ± 2.85		
Đo màu	Mặt đậm	L* = 37,297	a* = -10,077	b* = 15,137
	Mặt nhạt	L* = 48,467	a* = -11,077	b* = 18,580

Bảng 4. Hàm lượng chlorophyll trong lá mướp so với các nguyên liệu giàu chlorophyll phổ biến khác

Nguyên liệu	Lượng chlorophyll (mg/g)
Lá mướp	4,31
Lá dứa (Le, 2000)	4,91
Súp lơ xanh (Garcia & ctv., 2000)	2,95
Tảo Spirulina (Duong & ctv., 2010)	1,0
Rau bina (Le, 2014)	6,98

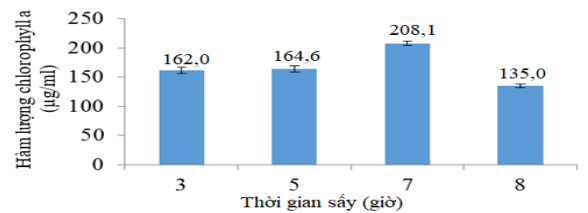
Bảng 5. Kết quả độ ẩm lá mướp sau khi sấy

Thời gian sấy (giờ)	3	5	7	8	9
Độ ẩm (%)	35,08 ± 1,05	30,92 ± 1,22	24,23 ± 0,95	20,12 ± 1,06	20,01 ± 0,85

Bảng 4 cho thấy, hàm lượng chlorophyll trong lá mướp là khoảng 4,31 mg/g, tương đương với lá dứa (là loại lá có hàm lượng chlorophyll cao phổ biến, thường được dùng để tạo màu trong chế biến thực phẩm). Hiện nay xu hướng chiết chlorophyll từ tảo biển khá phổ biến do lượng chlorophyll chiết được cao đồng thời không qua giai đoạn tinh sạch phức tạp, tuy nhiên việc dùng lá mướp chiết chlorophyll có thể tận dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có giúp nâng cao hiệu quả kinh tế của cây mướp hương.

Hình 1 & Bảng 5 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo thời gian sấy và độ ẩm nguyên liệu. Thời gian sấy 8h (độ ẩm khoảng 20,12%), hàm lượng chlorophyll bắt đầu giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy thời gian sấy ảnh hưởng có ý nghĩa lên hàm lượng chlorophyll ở độ tin cậy 95%. Hàm lượng chlorophyll cao nhất ở thời gian sấy 7 giờ và khác biệt có ý nghĩa so với các thời gian sấy khác ($P < 0,05$). Chọn thời gian sấy 7 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo. Nếu tiếp tục sấy lên 8 giờ thì hàm lượng chlorophyll a bắt đầu giảm vì chlorophyll dễ bị phân hủy ở nhiệt độ trên 50⁰C khi sấy trong thời gian dài và hàm lượng acid có trong dịch bào của lá kết hợp với nhiệt độ cao làm chlorophyll chuyển hóa thành pheophytin (có màu xanh olive). Ngược lại, với thời gian sấy thấp hơn 7 giờ thì độ ẩm của nguyên liệu còn cao làm giảm hiệu suất tách chlorophyll; đồng thời, độ ẩm cao còn là nguyên nhân góp

phần đẩy nhanh quá trình oxy hóa chlorophyll trong nguyên liệu (Putra & ctv., 2017).

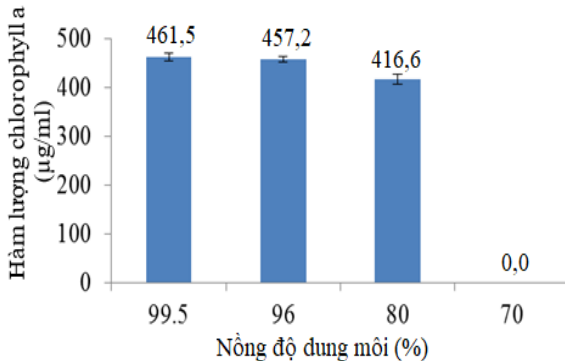


Hình 1. Ảnh hưởng của thời gian sấy đến hàm lượng chlorophyll a.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 2 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo nồng độ dung môi và ở nồng độ ethanol 96% thì hàm lượng chlorophyll bắt đầu giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của nồng độ dung môi lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$), hàm lượng chlorophyll ở nồng độ 99,5% là cao nhất nhưng do khác biệt không ý nghĩa với nồng độ 96% ở độ tin cậy 95% nên chọn ethanol 96% làm dung môi cho các thí nghiệm sau. Nồng độ ethanol càng cao, lượng nước trong dung môi ít, độ phân cực của dung môi giảm nên chlorophyll dễ dàng ra khỏi nguyên liệu. Ethanol 70% có hàm lượng nước khá

cao (chiếm 42% thể tích) nên mẫu bị oxi hóa do oxi trong nước sẽ phản ứng với chlorophyll khi tiếp xúc trong thời gian dài sẽ làm mẫu chiết có màu ngả sang vàng nên không tiến hành xác định hàm lượng chlorophyll.



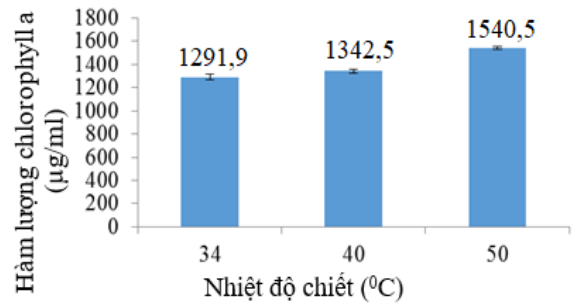
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng chlorophyll a.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hàm lượng chlorophyll a thu được

Hình 3 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo nhiệt độ và tăng ở nhiệt độ 50°C. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$), hàm lượng chlorophyll ở 50°C là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Ở 60°C thì chlorophyll bắt đầu chuyển sang màu vàng do chlorophyll chuyển thành pheophytin, nên thí nghiệm chỉ dừng lại ở nhiệt độ 50°C để đảm bảo chlorophyll không bị biến đổi. Nhiệt độ tăng, quá trình thẩm thấu dung môi vào thành tế bào và hòa tan chlorophyll vào dung môi diễn ra nhanh hơn, đồng thời quá trình khuếch tán chlorophyll ra khỏi vách tế bào sẽ diễn ra nhanh hơn làm cho lượng chlorophyll thu được càng nhiều.

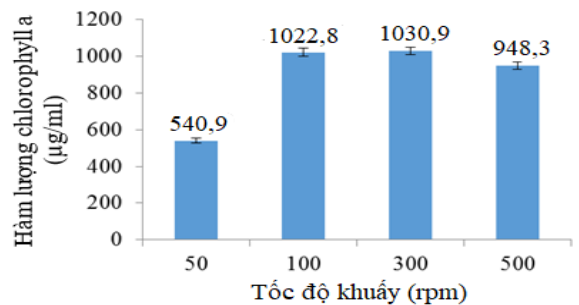
3.4. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 4 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo tốc độ khuấy và ở tốc độ khuấy 500 vòng/phút hàm lượng chlorophyll giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của tốc độ khuấy lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$), hàm lượng chlorophyll ở tốc độ khuấy 300 rpm là cao nhất nhưng



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng chlorophyll a.

do khác biệt không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% với tốc độ khuấy 100 rpm nên chọn 100 rpm cho các thí nghiệm tiếp theo. Tốc độ khuấy càng tăng hàm lượng chlorophyll thu được càng cao do nhiệt độ cao thì các phân tử hạt di chuyển nhanh hơn làm tăng khả năng thẩm thấu qua thành tế bào. Khi tăng tốc độ khuấy lên 500 rpm thì lượng chlorophyll bắt đầu giảm do tốc độ khuấy cao 1 phần chlorophyll sẽ bị oxi hóa, 1 phần do độ nhớt của dịch tăng làm giảm hiệu quả chiết màu.



Hình 4. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hàm lượng chlorophyll a.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian khuấy tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 5 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo thời gian khuấy và ở thời gian khuấy 120 phút thì hàm lượng chlorophyll giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của thời gian khuấy lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$), hàm lượng chlorophyll ở 90 phút là cao nhất và khác biệt ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thời gian khuấy càng lâu sẽ làm tăng thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi nên hàm lượng chlorophyll thu được

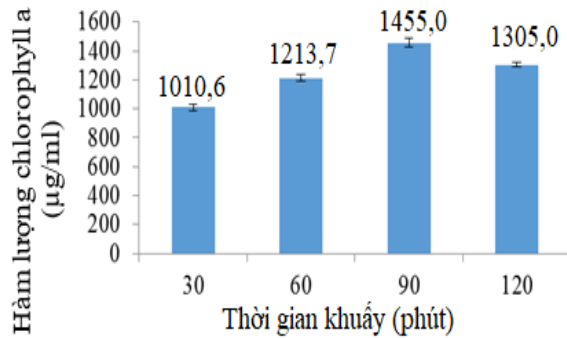
Bảng 6. Sự ảnh hưởng của các yếu tố tối ưu lên hàm lượng chlorophyll

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob > t
Intercept	1.322,191	54,339	24,33	< ,0001*
Thời gian khuấy (60, 120)	325,835	3.197,027	1,02	0,3549
Nhiệt độ khuấy (45, 55)	-485,252	3.197,027	-1,52	0,1895
Tốc độ khuấy (0, 200)	90,1415	3.197,027	2,82	0,0371*
Thời gian khuấy* Nhiệt độ khuấy	983,225	3.574,384	0,28	0,7943
Thời gian khuấy*Tốc độ khuấy	-118,745	3.574,384	-0,33	0,7532
Nhiệt độ khuấy*Tốc độ khuấy	-28,388	3.574,384	-0,79	0,4631
Thời gian khuấy*Thời gian khuấy	5.741,772	6.304,622	-0,91	0,4042
Nhiệt độ khuấy*Nhiệt độ khuấy	1.130,852	6.304,622	-1,79	0,1328
Tốc độ khuấy*Tốc độ khuấy	203,7637	6.304,622	-3,23	0,0232*

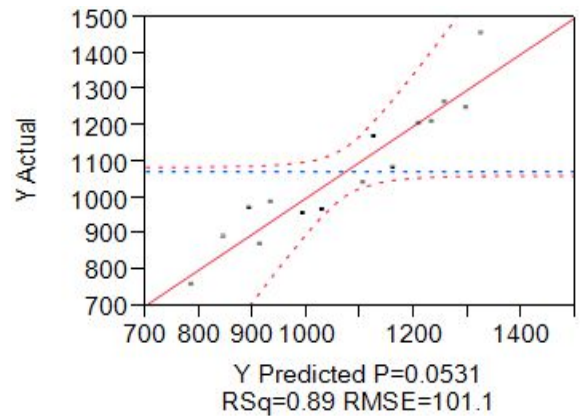
Bảng 7. Kết quả tối ưu

Yếu tố	Giá trị đề xuất	Giá trị làm tròn
Thời gian khuấy (60,120)	97,198794	97
Nhiệt độ khuấy (45,55)	48,834786	49
Tốc độ khuấy (0,200)	123,04329	123
Giá trị chlorophyll dự đoán	1342,1403	
Giá trị chlorophyll thực	1294,229 ± 14,305	

càng cao.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian khuấy đến hàm lượng chlorophyll a.



Hình 6. Phương trình hồi quy.

$$Y = 1.322,191 + 90,1415X_3 - 203,7637X_3^2$$

3.6. Tối ưu hóa điều kiện chiết chlorophyll a

Phương trình hồi quy giữa hiệu suất tách chiết chlorophyll với thời gian khuấy, nhiệt độ khuấy và tốc độ khuấy với hệ số tương quan R2 = 0,89 cho thấy chúng có tương quan chặt chẽ (Hình 6).

Bảng 6 cho ta thấy tốc độ khuấy (X3) ảnh hưởng có ý nghĩa tới hàm lượng chlorophyll, thời gian khuấy và nhiệt độ khuấy ảnh hưởng không có ý nghĩa. Phương trình đáp ứng hàm lượng chlorophyll như sau:

Hàm lượng chlorophyll sau khi tiến hành thí nghiệm thực tế có độ chênh lệch 3,57% (không vượt quá 5%) so với hàm lượng chlorophyll dự đoán (Bảng 7). Vì vậy các giá trị thời gian, nhiệt độ và tốc độ khuấy tối ưu để đạt hàm lượng chlorophyll cao nhất lần lượt là 97 phút, 49°C và 123 vòng/phút.

3.7. Khảo sát thành phần hóa lý thành phẩm

Bảng 8 cho thấy thành phẩm có màu xanh nhạt và tốt hơn lá tươi. Quá trình chiết và cô quay loại

Bảng 8. Kết quả đo màu Lab của thành phẩm

	L*	a*	b*
Cao chiết chlorophyll	36,97	0,28	1,52
Lá tươi	Mặt đậm	37,297	-10,077
	Mặt nhạt	48,467	-11,077

Bảng 9. Định tính thành phần hóa học trong dịch chiết lá mướp

Thành phần	Kết quả
Glycoside	Không
Saponin, Alkaloid	Có
Độ ẩm	74,47% ± 2,55
Hàm lượng chlorophyll ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1423,069 ± 22,422

Bảng 10. Kết quả đo hàm lượng vi sinh vật và kim loại nặng

TT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả	Phương pháp thử nghiệm	Giới hạn cho phép
1	Chì (Pb)	mg/kg	Âm tính (LOD = 0,01)	AOAC 999.11(*)	2,0 mg/kg
2	Thủy ngân (Hg)	mg/kg	Âm tính (LOD = 0,01)	AOAC 971.21	0,05 mg/kg
3	Tổng số vi khuẩn hiếu khí	CFU/g	$2,1 \times 10^4$	ISO 4833-1:2013	$10^4/\text{g}$
4	Escherichia Coli	CFU/g	Âm tính	ISO 16649-2:2001	3/g
5	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	CFU/g	Âm tính	ISO 21527-2:2008	$10^2/\text{g}$
6	Salmonella	CFU/25 g	Âm tính (LOD = 0,01)	ISO 6579-1:2017	Không có

dung môi làm cho chlorophyll bị oxy hóa và biến đổi một phần thành pheophytin nên thành phẩm sẽ có màu vàng chiếm ưu thế hơn màu xanh.

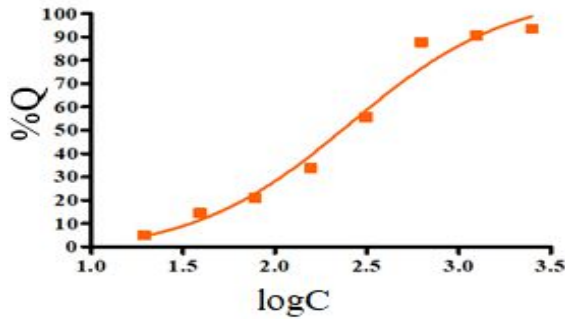
Bảng 9 cho thấy sau quá trình cô quay thì trong thành phẩm chỉ còn lại saponin và alkaloid, glycoside mất đi trong quá trình cô quay dựa trên phương pháp định tính màu (Chakraborty & ctv., 2017). Độ ẩm thành phẩm xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ sấy là 53°C , cân khối lượng không đổi và giá trị độ ẩm là $74,47\% \pm 2,55$. Hàm lượng chlorophyll trong thành phẩm xác định bằng phương pháp UV-VIS, nhận thấy hàm lượng chlorophyll là $1423,069 \pm 22,422 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Bảng 10 cho thấy trong thành phẩm không phát hiện Hg, Pb, E.Coli, Salmonella, nấm men, nấm mốc. Tổng số vi khuẩn hiếu khí phát hiện nằm trong giới hạn cho phép theo QĐ 46/2007 – BYT.

3.8. Xác định khả năng kháng oxi hóa của mẫu theo phương pháp DPPH

Mẫu Chlorophyll : $\text{IC}_{50} = 261,7 \pm 2,108 \mu\text{g}/\text{ml}$;
Vitamin C : $\text{IC}_{50} = 16,37 \pm 1,458 \mu\text{g}/\text{mL}$

IC_{50} là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao. Khả năng kháng oxi hóa của sản phẩm chlorophyll ($\text{IC}_{50} = 261,7 \mu\text{g}/\text{mL} = 0,262 \text{ mg}/\text{mL}$) thấp hơn gần 16 lần so với vitamin C ($\text{IC}_{50} = 0,0164 \text{ mg}/\text{mL}$), cao hơn so với lá chùm ngây ($\text{IC}_{50} = 0,537 \text{ mg}/\text{mL}$) (Phan & Nguyen, 2016). Biểu đồ phần trăm bất gốc tự do DPPH theo nồng độ chlorophyll thể hiện ở Hình 7.



Hình 7. Biểu đồ phần trăm bắt gốc tự do DPPH theo nồng độ chlorophyll.

4. Kết Luận

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chiết chlorophyll từ lá mướp bao gồm: ngâm chiết bằng ethanol 96%, tốc độ khuấy là 123 vòng/phút, thời gian chiết là 97 phút, nhiệt độ chiết ở 49^oC là phù hợp nhất. Màu xanh chlorophyll thành phẩm có độ ẩm khoảng 74,47%. Các nghiên cứu tiếp theo cần làm giảm độ ẩm của cao chlorophyll và theo dõi chất lượng sản phẩm theo thời gian bảo quản. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại nặng ta nhận thấy chế phẩm màu xanh chlorophyll đạt các chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại nặng (Pb, Hg) theo quyết định của Bộ Y tế 46/2007 QĐ – BHYT. Ngoài ra nghiên cứu cũng khảo sát khả năng kháng oxy hóa của màu xanh chlorophyll từ lá mướp với giá trị IC₅₀ = 261,7 μg/mL

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Chakraborty, S., Sahoo, S., Anjana, B., & Dixit, S. (2017). Studies on antimicrobial activity, phytochemical screening tests, biochemical evaluation of *Clitorea ternatea* linn. *Plant extracts* 5(10), 197-208.
- Costache, A. M., Campeanu, G., & Neata, G. (2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters* 17, 7702-7708.
- Duong, L. T., Le, H. T., & Vu, T. T. (2010). Functional food - sustainable health, Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.
- Garcia, C., Martinez., T., & Lopez A. (2000). Measurement of chlorophyll contents in broccoli using spectrophotometer. *Journal of Science and Food Agriculture* 45(2), 456-460.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: A Review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering* 39, 32-44.
- Le, H. M. (2014). *Canned food technology*. (Unpublished master's thesis). University of Science, Ha Noi, Vietnam.
- Le, N. T. V. (2000). *Procedures for collection of Chlorophyll from pandan leaves*. (Unpublished master's thesis). HUTECH University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Nguyen, V. T. (2016). *Herbal garden: luffa aegyptiaca*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Tre Publishing House.
- Phan, T. T. B., & Nguyen, M. T. D. (2006). Study of antioxidant activity on leaves and stem of *Moringa oleifera*. *Can Tho University Journal of Science* 3, 179-184.
- Putra, M. D., Darmawan, A., Wahdini, I., & Abasaeed, E. A. (2017). Extraction of chlorophyll from pandan leaves using ethanol and mass transfer study. *Journal of the Serbian Chemical Society* 82, 921-931.
- Rajalakshmi, K., & Banu, N. (2015). Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *International Journal of Science and Research* 4, 209-212.
- Ridwan, A. M., Noor E., Rusli S. M., & Akhiruddin M. (2017). Introductory Study towards the extraction of chlorophyll pigment from *Sargassum*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 35, 211-221.