

## MỘT PHƯƠNG PHÁP MỚI TRÍCH LY CHẤT KHÔ HÒA TAN TỪ LÁ SEN HỒNG (*NELUMBO NUCIFERA*)

Hồ Công Trục\*, Bùi Hữu Thuận\*, Trần Tấn Thông

### TÓM TẮT

*Tác dụng của lá sen với sức khỏe con người từ lâu đã được công nhận; tuy nhiên, ở Việt Nam, lá sen thường được dùng ở dạng sơ chế. Nghiên cứu này khảo sát một số phương pháp trích ly chất khô từ lá sen nhằm nâng cao giá trị sử dụng của nó. Trong đó, ảnh hưởng của loại dung môi; nồng độ cồn và một số phương pháp trích ly lên hiệu suất được tiến hành bằng thí nghiệm một nhân tố. Và phương pháp bề mặt đáp ứng cũng được dùng để quan sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý nguyên liệu bằng sóng siêu âm lên hiệu suất trích ly. Theo đó, hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen với cồn 70% bằng Soxhlet có hỗ trợ của sóng siêu âm cao hơn các phương pháp được khảo sát. Trong khoảng nhiệt độ và thời gian xử lý siêu âm, hiệu suất trích ly không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Tuy vậy, trích ly chất khô từ lá sen có hỗ trợ của siêu âm là một phương pháp hiệu quả.*

### ABSTRACT

*The benefits of lotus leaf on human health have been approved for many years; however, lotus leaf is often used in simple form. This thesis investigated some extraction methods of concrete from lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn) to enhance its using values. The effect of solvent types, ethanol concentrates and some methods on extracting yield by one factor experiment is carried out. We also studied the temperature and time of material treatment by ultrasound on the yield. The results showed that, concrete extraction yield from lotus leaf using ethanol 70% by Soxhlet with ultrasound assisted was greater than others observed methods. However, with the time and temperature of ultrasound treatment on material, the extracting yield was not statistically different at the 5% significance. Nevertheless, ultrasound assisted extraction of concrete from lotus leaf is a helpful method.*

*Từ khóa: extraction, lotus, yield, ultrasound*

### 1. Giới thiệu

Cây sen thuộc loài *Nelumbo nucifera*

Gaertn, ngành Ngọc Lan (magnoliophyta), lớp Ngọc Lan (magnoliopsida), phân lớp Sen (*Nelumbonidae*), bộ Sen (*Nelumbonales*), họ Sen (*nelumbonaceae*), chi *Nelumbo* Adans [9]. Theo các nghiên cứu trước đây, lá sen có các thành

\* Thạc sĩ, Khoa Khoa học Nông nghiệp, Trường Đại học Cửu Long

phần chính là các alkaloids gồm có nuciferine, roemerine và N-demethylarmepavine. Đây là những thành phần có hoạt tính sinh học đáng kể bao gồm chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng HIV, chống béo phì, cao huyết áp [10]. Bên cạnh, các chất có trong lá sen như quercetin - 3 - O - a - arabinopyranosyl - (1→2) - β - galactopyranoside, catechin, hyperoside, isoquercitrin and astragalin có tác dụng phân giải lipid; các flavonoids có tác dụng giảm cholesterol trong máu [7].

Siêu âm là sóng cơ học hình thành do sự lan truyền dao động của các phần tử trong không gian có tần số lớn hơn giới hạn trên ngưỡng nghe của con người (16 - 20 kHz) [5]. Sóng siêu âm, có tần số trên 20 kHz, giúp cho quá trình trích ly các thành phần hữu cơ và vô cơ từ nguyên liệu rắn bằng các dung môi lỏng dễ dàng hơn. Dưới tác dụng của sóng siêu âm, các bong bóng khí được tạo ra trong lòng chất lỏng [1]. Khi đạt đến một thể tích mà tại đó, các bong bóng này không thể tiếp tục hấp thụ năng lượng, chúng vỡ ra một cách đột ngột và nhanh chóng; nhiệt độ và áp suất cục bộ tăng lên rất cao (khoảng 4000K và 1000 atm) [5]. Quá trình này làm cho tế bào nguyên liệu bị phá vỡ, phóng thích chất trích vào dung môi. So với các phương pháp trích ly thông thường, trích ly có sóng siêu âm hỗ trợ là một trong những phương pháp đơn giản, chi phí thấp, có thể sử dụng với nhiều loại dung môi khác nhau và thích hợp cho quy mô công nghiệp [1].

## 2. Phương tiện và phương pháp

### 2.1. Hóa chất

Cồn tuyệt đối xuất xứ từ Trung Quốc.

### 2.2. Dụng cụ

Dụng cụ chính được dùng trong thí nghiệm này là thiết bị trích ly Soxhlet và bể xử lý siêu âm hiệu Elma, model S120H (Đức).

### 2.3. Xử lý mẫu

Lá sen bánh tẻ (không già, không non) được thu hái ở ao sen Trường Đại học Cửu Long. Sau đó, chúng được rửa sạch, cắt thành sợi với chiều rộng khoảng 3 - 5 mm, sấy ở  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 16 giờ, làm nhỏ kích thước và bảo quản ở  $10^\circ\text{C}$  để tiến hành các thí nghiệm.

### 2.4. Các phương pháp trích

- Ngâm: 10 g mẫu được cho vào túi vải và ngâm trong cốc (đã biết khối lượng) chứa 250 mL dung môi ở nhiệt độ phòng.

- Trích ly bằng Soxhlet:

10 g mẫu được cho vào một túi vải, trích ly trong 250 mL dung môi trong 6 giờ.

- Trích ly bằng Soxhlet có siêu âm hỗ trợ: tiến hành tương tự như phương pháp trên nhưng mẫu được xử lý siêu âm ở nhiệt độ và thời gian nhất định trước khi trích ly.

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Sau khi trích ly, các mẫu được đun nhẹ để cồn bay hơi hết và sấy ở  $105^\circ\text{C}$  đến khối lượng không đổi. Khối lượng chất trích  $m$  (g) và hiệu suất trích ly  $y$  (%) lần lượt được xác định bằng các công thức sau:

$$m = m_2 - m_1$$

$$y = \frac{m}{m_0} \times 100\%$$

Trong đó,

$m_0$  - khối lượng nguyên liệu trích (g)

$m_1$  - khối lượng bình cầu (g)

$m_2$  - khối lượng bình và chất trích (g)

### 2.5. Phương pháp quy hoạch thí nghiệm

- Thí nghiệm một nhân tố: để khảo sát ảnh hưởng của loại dung môi (nước cất và cồn), nồng độ cồn và các phương pháp khác nhau lên hiệu suất trích ly.

- Thực nghiệm yếu tố toàn phần  $n^k$  với  $n$  là số mức của mỗi yếu tố ( $n=2$ ) và  $k$  là số

yếu tố ( $k=2$ ). Mô hình được chọn là mô hình tuyến tính:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

Trong đó,

$b_0$  - hệ số tự do

$b_1, b_2$  - hệ số hồi quy

$b_{12}$  - hệ số tương tác đôi

$y$  - hàm đáp ứng, hàm lượng chất trích thu được so với nguyên liệu khô (%).

Bảng 1. Thực nghiệm toàn phần 2 yếu tố

| Số thứ tự thí nghiệm | $x_0$ | $x_1$ | $x_2$ | $x_1x_2$ | $y$ |
|----------------------|-------|-------|-------|----------|-----|
| 1                    | +     | +     | +     | +        |     |
| 2                    | +     | -     | -     | +        |     |
| 3                    | +     | +     | -     | -        |     |
| 4                    | +     | -     | +     | -        |     |

Các hệ số  $b_j, b_{ij}$  được tính toán như sau:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i; \quad j = 0: k$$

$$b_{12} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{1i} x_{2i} y_i$$

Trong đó,  $N$  - số thí nghiệm ( $N=4$ )

Kiểm tra ý nghĩa của các hệ số hồi quy và tính tương hợp của phương trình hồi quy lần lượt bằng tiêu chuẩn Student và tiêu chuẩn Fisher [6].

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Xác định độ ẩm của nguyên liệu

Độ ẩm của nguyên liệu được xác định bằng công thức sau:

$$\text{Hàm ẩm (\% căn bản ướt)} = ((\text{khối lượng đầu} - \text{khối lượng sau khi sấy}) / \text{khối lượng đầu}) * 100\%$$

Các mẫu có khối lượng khác nhau có thể là do sự khác nhau về khối lượng riêng giữa lá và gân lá. Mẫu được lấy ở vị trí không có hoặc ít gân lá thì khối lượng sau khi sấy có thể khác so với mẫu được lấy ở vị trí có nhiều gân lá.

Bảng 2. Độ ẩm nguyên liệu

| Mẫu        | Khối lượng trước khi sấy (g) | Khối lượng sau khi sấy (g) | Hàm ẩm (%) |
|------------|------------------------------|----------------------------|------------|
| 1          | 20                           | 4,22                       | 78,9       |
| 2          | 20                           | 4,86                       | 75,7       |
| 3          | 20                           | 6,37                       | 68,2       |
| Trung bình |                              |                            | 74,27      |

Theo Văn Quốc Hoàng (2012), độ ẩm của lá sen trồng ở huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam là 71,47%. Theo tác giả, giá trị độ ẩm có thể thay đổi tùy thuộc vào địa điểm và thời gian lấy mẫu cũng như độ thuần thực của lá sen thí nghiệm [9].

### 3.2. Ảnh hưởng của loại dung môi đến hiệu suất trích ly lá sen

10 g nguyên liệu được trích ly với nước cất bằng hệ thống Soxhlet trong 6 giờ; tiến hành tương tự với cồn 70%. Các thí nghiệm

được lặp lại 3 lần. Sau khi tiến hành khảo sát, kết quả được trình bày trong bảng 3.

Số liệu cho thấy, cồn 70% có thể hòa tan được khối lượng chất tan trong nguyên liệu lớn hơn so với nước cất ở nhiệt độ sôi của chúng. Điều này có thể được giải thích do độ phân cực của một số chất được trích gần với độ phân cực của cồn hơn so với nước cất.

Theo nghiên cứu của Gnana Joyce *et al.* (2014), cồn và nước có thể hòa tan được các chất trong cây sen như:

Bảng 3. Loại dung môi và hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

| Loại dung môi | Hiệu suất trích ly (%) |
|---------------|------------------------|
| Nước cất      | 12,7 <sup>a</sup>      |
| Cồn 70%       | 18,5 <sup>b</sup>      |

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)

Flavanoids, terpenoids, phenol, coumarins, sterols và phytosterols trong cây sen. Cũng theo tác giả này, những chất có thể tan trong cồn mà không tan trong nước bao gồm quinine và cardiac glycosides; trong khi tannins có thể tan trong nước mà không tan trong cồn [2]. Theo Hoàng Thị Tuyết Nhung (2012), lá sen

có chứa nhiều alkaloids, trong đó, nuciferin là thành phần chính, chất này tan tốt trong  $\text{CHCl}_3$ , methanol, cồn, tan rất ít trong nước [3].

Từ kết quả thí nghiệm cũng như tài liệu tham khảo, cồn được chọn làm dung môi để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến hiệu suất trích ly lá sen

10 g nguyên liệu được ngâm trong cồn

50% trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng; tiến hành tương tự đối với cồn 70% và 90%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được trình bày trong bảng 4 và hình 1.

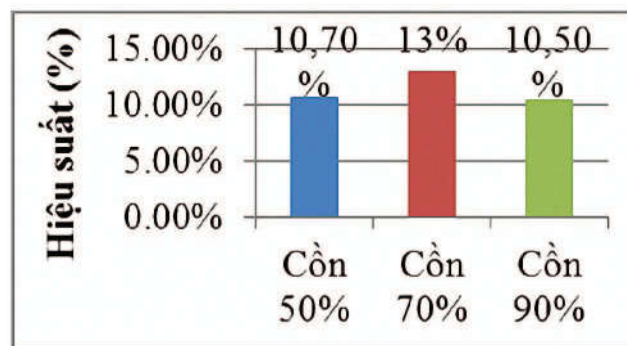
Bảng 4. Nồng độ cồn và hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

| Nồng độ cồn (%) | Hiệu suất (%)     |
|-----------------|-------------------|
| 50              | 10,7 <sup>a</sup> |
| 70              | 13 <sup>b</sup>   |
| 90              | 10,5 <sup>a</sup> |

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)

Kết quả của thí nghiệm này phù hợp với nghiên cứu của Lan Zhang *et al.* (2009). Theo các tác giả, hiệu suất trích ly flavonoids

tăng khi nồng độ cồn tăng trong khoảng 40 - 70%; nồng độ cồn trên 70%, hiệu suất trích ly flavonoids giảm.



Hình 1. Nồng độ cồn và hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

Theo các tác giả, cồn có thể kết hợp với các flavonoids thông qua các liên kết cộng hóa trị và thúc đẩy quá trình khuếch tán của chất tan vào trong dung môi. Nồng độ cồn khác nhau ảnh hưởng khác nhau lên độ phân cực của dung môi và do đó ảnh hưởng rất khác nhau lên việc cải thiện độ hòa tan của flavonoids. Hiệu suất trích ly cao nhất đạt được khi độ phân cực của dung môi và của flavonoids tương tự nhau [8]. Trong thí nghiệm này, ngoài flavonoids, có thể một số chất khác cũng hòa tan nhiều hơn trong cồn 70%. Vì vậy, cồn 70% được lựa chọn làm dung môi trích ly trong thí nghiệm tiếp theo.

### 3.4. Ảnh hưởng của phương pháp trích ly đến hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

Thí nghiệm này khảo sát ba phương pháp khác nhau gồm trích ly lá sen bằng hệ thống Soxhlet trong 6 giờ, trích bằng Soxhlet trong 6 giờ có xử lý trước nguyên liệu bằng siêu âm ở 55°C, 15 phút và phương pháp ngâm nguyên liệu trong 72 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 5 và hình 2.

Hiệu suất trích ly của ba phương pháp được trình bày ở trên khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%. Trong đó, phương

pháp trích ly có xử lý trước nguyên liệu bằng sóng siêu âm trong thời gian 15 phút, ở nhiệt độ 55°C có hiệu suất trích ly cao hơn so với hai phương pháp còn lại (lần lượt là 20,1%, 18,5% và 15,9%).

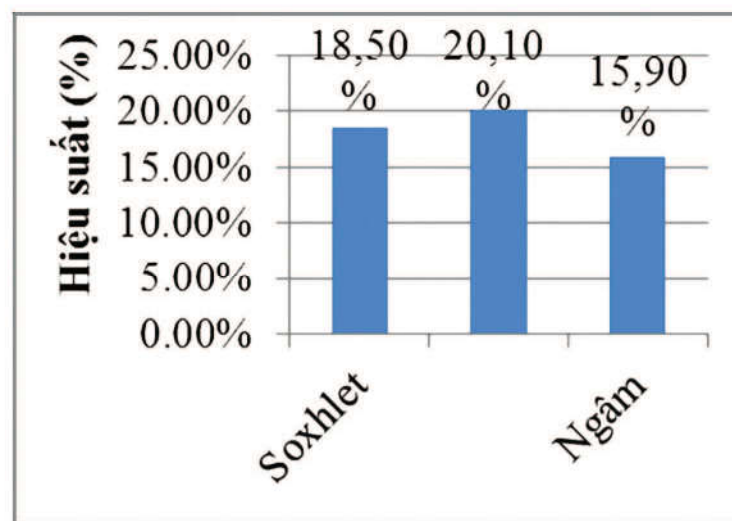
Theo nghiên cứu của Lan Zhang *et al.*

(2009), lá sen được xử lý trước bằng sóng siêu âm ở 40°C trong 25 phút sau đó ngâm trong cồn trong 4 giờ cho hiệu suất trích ly flavonoids là 7,15%, cao hơn phương pháp ngâm ở nhiệt độ 25°C trong 8 giờ (5,28%) và trích ly trong 2,5 giờ ở 20°C có hỗ trợ của microwave trong 5 phút (hiệu suất 6,61%).

Bảng 5. Phương pháp và hiệu suất thu hồi chất khô từ lá sen

| Phương pháp               | Hiệu suất (%)     |
|---------------------------|-------------------|
| Soxhlet                   | 18,5 <sup>a</sup> |
| Soxhlet có siêu âm hỗ trợ | 20,1 <sup>b</sup> |
| Ngâm                      | 15,9 <sup>c</sup> |

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%)



Hình 2. Phương pháp trích ly và hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

### 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian xử lý nguyên liệu bằng sóng siêu âm đến hiệu suất trích ly lá sen

Thí nghiệm này khảo sát hai yếu tố: nhiệt độ ( $Z_1$ : 40 - 70°C) và thời gian ( $Z_2$ : 5 - 25 phút) xử lý siêu âm với các mức được trình bày trong

bảng 6. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình. Số liệu thí nghiệm được trình bày trong bảng 7:

Sau khi tính toán và kiểm định theo tiêu chuẩn Student, các hệ số  $b_p$ ,  $b_2$

Bảng 6. Các mức yếu tố

| Các mức           | Yếu tố    | $Z_1$ | $Z_2$ |
|-------------------|-----------|-------|-------|
|                   | Mức cơ sở |       | 55    |
| Khoảng biến thiên |           | 15    | 10    |
| Mức trên (+)      |           | 70    | 25    |
| Mức dưới (-)      |           | 40    | 5     |

Bảng 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian siêu âm đến hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen

| STT | $x_0$ | $x_1$ | $x_2$ | $x_1x_2$ | $y(\%)$ |
|-----|-------|-------|-------|----------|---------|
| 1   | +1    | -1    | -1    | +1       | 20,6    |
| 2   | +1    | +1    | -1    | -1       | 21,2    |
| 3   | +1    | -1    | +1    | -1       | 20,8    |
| 4   | +1    | +1    | +1    | +1       | 21,1    |

$b_{12}$  không có ý nghĩa.

Do đó, có thể kết luận: nhiệt độ và thời gian và tương tác giữa hai yếu tố này trong khoảng khảo sát ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen với độ tin cậy 95%.

#### 4. Kết luận

Trích ly lá sen bằng cồn 70% có xử lý nguyên liệu bằng sóng siêu âm đạt hiệu suất cao nhất trong các phương pháp được khảo sát.

Trong khoảng nhiệt độ và thời gian xử lý siêu âm trên nguyên liệu, lần lượt là 40-70°C và 5-25 phút, hiệu suất trích ly chất khô từ lá sen không có khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Do đó, khoảng thời gian và nhiệt độ khác cần được đánh giá trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali Khoddami, Meredith A. Wilkes and Thomas H. Roberts, 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Molecules. 18: 2328-2375.
2. Gnana joyce, A. And estherlydia, D, 2014. Phytochemical screening and antioxidant activity of lotus (*nelumbo nucifera*) stem. International Journal Of Pharma and Bio Sciences. 5(4): (B) 385 - 393.
3. Hoàng Thị Tuyết Nhung, 2012. Nghiên cứu chiết xuất và tinh chế Conessin, Kaempferol, Nuciferin từ dược liệu làm chất chuẩn đối chiếu trong kiểm nghiệm thuốc. Luận án Tiến sĩ. Trường Đại học Dược Hà Nội.

4. Lan Zhang, Shan Ying, Tang Keji, Putheti Ramesh, 2009. Ultrasound - assisted extraction flavonoids from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) leaf and evaluation of its anti - fatigue activity. *International Journal of Physical Sciences*. 4: 418-422.
5. Mai Thị Hải Anh, Nguyễn Thị Ngân, Nguyễn Ngọc Tú Anh, Nguyễn Thị Nguyên Thảo, 2010. Sử dụng sóng siêu âm trích ly Isoflavone. Tiểu luận. Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh.
6. Nguyễn Cảnh, 2004. Quy hoạch thực nghiệm. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh, 117 trang.
7. Nishkruti R Mehta, Ekta P Patel Pragnesh V Patani; Biren Shah, 2013. *Nelumbo Nucifera* (Lotus): A Review on Ethanobotany, Phytochemistry and Pharmacology. *Indian J.Pharm.Biol.Res.* 1(4):152-167.
8. Pulok K. Mukherjee, R. Balasubramanian, Kakali Saha, B.P Saha and M. Pal, 1996. A review on *nelumbo nucifera gaertn*. *Ancient Science of life*. 4: 268-276.
9. Văn Quốc Hoàng, 2012. Khảo sát thành phần hóa học của lá sen được thu hái ở huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam. Khóa luận tốt nghiệp. Trường Đại học Đà Nẵng. Đà Nẵng.
10. Xia Xu, Cui-Rong Sun, Xiao-Jing Dai, Rui-Lin Hu, Yuan-Jiang Pan and Zhang-Fa Yang, 2011. LC/MS Guided Isolation of Alkaloids from Lotus Leaves by pH-Zone-Refining Counter-Current Chromatography. *Molecules*. 16, 2551-2560.

Ngày nhận bài: 28/2/2017

Ngày gửi phản biện: 10/3/2017